



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Producción de la glicoproteína G recombinante del
virus de la laringotraqueitis infecciosa aviar utilizando
el sistema de expresión de baculovirus en células de
insecto**

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista
Biotecnólogo**

AUTOR

Juana Lady QUISPE CONISLLA

ASESORES

Martha Esther VALDIVIA CUYA

Manolo Clemente FERNÁNDEZ DÍAZ (Coasesor)

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Quispe, J. (2018). *Producción de la glicoproteína G recombinante del virus de la laringotraqueitis infecciosa aviar utilizando el sistema de expresión de baculovirus en células de insecto*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



12-R
88 P

Universidad Nacional Mayor De San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA GENETISTA BIOTECNÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**


Siendo las 10.15 horas del 21 de mayo de 2018, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga de JUANA LADY QUISPE CONISLLA.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 002-EPGB-2018, la titulando expuso su tesis: "PRODUCCIÓN DE LA GLICOPROTEÍNA G RECOMBINANTE DEL VIRUS DE LA LARINGOTRAQUEITIS INFECCIOSA AVIAR UTILIZANDO EL SISTEMA DE EXPRESIÓN DE BACULOVIRUS EN CÉLULAS DE INSECTO", y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 2.9, calificativo: Aprobado con Máxima honra


Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga a JUANA LADY QUISPE CONISLLA y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 11.30 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 21 de mayo de 2018.


Dr. SUSANA GUTIERREZ MORENO
(PRESIDENTA)


Mg. MARTHA VALDIVIA CUYA
(ASESORA)


Dra. EGMA MAYTA HUATUCO
(MIEMBRO)


Mg. MARIO ALCARRAZ CURI
(MIEMBRO)

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento:

A mi familia por haberme brindado su apoyo en todo momento, a mi hijo Ian Marcel por su paciencia y amor puro, a mi madre por su ejemplo de perseverancia y fortaleza, a mi padre por su sensibilidad, a mis hermanos por sus enseñanzas y compañía, a mi abuelita por su ejemplo de batalla contra el cáncer, a mis tíos y primos por siempre tenderme una mano, a mis sobrino/as por sus inocencia y sueños.

A mi profesora Martha Valdivia, por su ejemplo como investigadora y madre, su entusiasmo y perseverancia, porque en el laboratorio LFRA comenzó mi pasión por la investigación

Al Dr. Jorge Bendezú por el tiempo brindado en la asesoría del presente trabajo, su paciencia y sabios consejos. A la Mg. Sandra Morales por su enseñanza sobre el manejo de cultivos y otras técnicas moleculares y por sus consejos.

Al Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA) del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), a la empresa Farmacológicos Veterinarios SAC y FARVET SPF SAC quienes a través del proyecto de investigación: “Implementación de una plataforma de producción de anticuerpos monoclonales para el desarrollo de pruebas de diagnóstico rápido de importancia para sector pecuario” bajo el contrato N°021-2015-INIA-PNIA/UPMSI/IE, permitieron financiar la totalidad del presente trabajo; en especial al M.V. Manolo Fernández Díaz por brindar un espacio hospitalario y la oportunidad de investigar en Perú

A todos mis compañeros y amigos de la empresa FARVET SAC, en especial al Blgo. Jose Torriani por su enseñanza sobre el manejo de biorreactores, al Blgo. Ray Izquierdo y la Blga. Kathy Calderon por sus consejos y apoyo emocional.

A mis compañeros de la E.P de Genética y Biotecnología por su amistad y ejemplo de superación. En especial a mis mejores amigos Jorge Rúa y Alfredo Huamán, por los gratos momentos compartidos.

DEDICATORIA

A mi hijo Ian Marcel por su muestra de amor infinito, por acompañarme y llenar mi vida de felicidad.

A mi madre, por haberme acompañado siempre, por mostrarme que se puede salir adelante a pesar de las adversidades, por su fortaleza y amor.

A todas las personas que luchan contra la Anorexia y Bulimia, por mostrarnos lo importante del calor familiar y que unidos todo se puede superar.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
TABLA DE CONTENIDOS	vi
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO-CONCEPTUAL	4
2.1 Virus de la Laringotraqueitis Infecciosa aviar	4
2.1.1 Laringotraqueitis Infecciosa	4
2.1.2 Clasificación, estructura y organización del genoma del VLTi	4
2.1.3 Identificación de proteínas virales inmunogénicas.....	5
2.2 Sistemas biológicos de producción de proteínas recombinantes.....	7
2.3 Plataforma de producción de proteínas recombinantes utilizando el sistema de Células de Insecto-Baculovirus	9
2.3.1 Baculovirus.....	9
2.3.2 Células de insecto	14
2.3.3 Producción en biorreactor utilizando BEVS	17
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	23
3.1 Hipótesis.....	23
3.2 Objetivos.....	23
3.2.1 Objetivo general	23
3.2.2 Objetivos específicos.....	23
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1 Materiales	24
4.1.1 Material Biológico:	24
4.1.2 Insumos químicos.....	24
4.1.3 Equipos y materiales de laboratorio.....	24
4.2 Métodos.....	27
4.2.1 Caracterización del crecimiento de la línea celular de insecto Sf-9 mantenida en suspensión en medio libre de suero.....	28
4.2.2 Amplificación del baculovirus BV-gpG.	30
4.2.3 Optimización de la producción de glicoproteína G a pequeña escala.	32

4.2.4	Establecimiento de los parámetros de operación del biorreactor Biostat B plus para el crecimiento de células Sf-9.....	38
4.2.5	Producción de la glicoproteína G recombinante en el biorreactor BIOSTAT B® plus Twin.	41
4.2.6	Evaluación de la productividad volumétrica de la glicoproteína G recombinante.....	42
V.	RESULTADOS.....	44
5.1	Cinética de crecimiento de la línea celular de insecto Sf-9 a pequeña escala ..	44
5.2	Optimización de la producción de la proteína recombinante a pequeña escala.	46
5.2.1	Determinación de la multiplicidad de infección (MOI) y tiempo de cosecha para la expresión de glicoproteína G-his <i>tagged</i>	46
5.2.2	Determinación del momento óptimo de infección.....	47
5.2.3	Efecto de la densidad celular al momento de infección en la producción de la gpG-his.....	49
5.3	Establecimiento de condiciones hidrodinámicas óptimas para el crecimiento de células Sf-9 en el Biorreactor Biostat B plus –CC twin.....	51
5.4	Producción de glicoproteína G en el biorreactor Biostat B plus.	54
VI.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	58
6.1	Cinética de crecimiento de la línea celular Sf-9 a pequeña escala.....	58
6.2	Efecto de la multiplicidad de infección (MOI) y tiempo de cosecha en la producción de gpG-his	60
6.3	Efecto de la fase de crecimiento al momento de infección en la producción de la glicoproteína G-his <i>tagged</i>	61
6.4	Producción de gpG-his en dependencia de la densidad celular al momento de infección.....	62
6.5	Efecto de las condiciones hidrodinámicas en el crecimiento de células Sf-9 en el Biorreactor Biostat B plus	63
6.6	Producción de glicoproteína G en el biorreactor Biostat B plus.	64
VII.	CONCLUSIONES.....	67
VIII.	RECOMENDACIONES	68
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
X.	ANEXOS	79

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Frascos de cultivo con diferentes volúmenes de trabajo.....	26
Tabla 2. Características de la cinética de crecimiento de las células Sf-9.....	46
Tabla 3. Influencia de la tasa de agitación en el crecimiento de células Sf-9	51
Tabla 4. Influencia del porcentaje de oxígeno disuelto en el crecimiento de células Sf-9 en medio Ex-cell 420™	52
Tabla 5. Influencia de la tasa de aireación en el crecimiento de células Sf-9.....	52
Tabla 6. Parámetros hidrodinámicos generados en el Biorreactor Biostat B plus durante el cultivo de células Sf-9.....	54
Tabla 7. Comportamiento de las células Sf-9 infectadas con el baculovirus Bv-gpG P4 de título $3,5 \times 10^7$ pfu/mL	55
Tabla 8. Comportamiento de las células Sf-9 infectadas con el baculovirus Bv-gpG P4 de título 3×10^7 pfu/mL.....	55
Tabla 9. Glicoproteína His-tagged determinada en cosecha de células Sf-9 infectadas con el baculovirus Bv-gpG en el biorreactor Biostat B plus empleando un ELISA cuantitativo tipo sandwich.....	57
Figura 1. BIOSTAT® B-CC Twin con UniVessel ® Glass.....	26
Fugira 2. Flujograma de trabajo para la producción de la glicoproteína G recombinante del Virus de la Laringotraqueitis Infecciosa aviar utilizando el sistema de Baculovirus en células de Insecto en el Biorreactor Biostat B plus-cc Twin.	27
Figura 3. Curva de crecimiento celular típico. Se muestra la fase de latencia, exponencial, estacionaria y de muerte celular.	29
Figura 4. Esquema de amplificación del stock de baculovirus BV-gpG.....	32
Figura 5. Distribución del MOI y tiempo de cosecha en placa de 24 pocillos.....	33
Figura 6. Diseño del experimento para la determinación del momento de infección óptimo para la producción de gpG-his.....	36
Figura 7. Esquema de trabajo para la determinación de la densidad celular óptima al momento de infección para la producción de gpG.....	37
Figura 8. Cinética de crecimiento de las células Sf-9 en matraz con 125 mL, matraz con 250 mL y en spinner con 200 mL.....	37
Figura 9. Linealización de la fase exponencial de crecimiento de las células Sf-9. A. Crecimiento en matraz con 125 mL. B. Crecimiento en matraz con 250 mL. C. Crecimiento en spinner con 200 mL	45

Figura 10. Células Sf-9 infectadas con el baculovirus BV-gpG a diferente Multiplicidad de infección (MOI) y tiempo de cosecha. El Western Blot fue realizado empleando un anticuerpo de ratón monoclonal anti-His conjugado con HRP (GenScript).....	47
Figura 11. Efecto del MOI y tiempo de cosecha en la expresión de gpG-his	47
Figura 12. Nivel de expresión de gpG-his en relación al tiempo de crecimiento de las células sf-9. Se identificó el tiempo óptimo de infección	48
Figura 13. Producción de gpG-his en dependencia del momento de infección. La expresión de gpG-his fue detectada mediante Western Blot empleando un anticuerpo monoclonal anti-his.....	49
Figura 14. Efecto de la densidad celular al momento de infección en la producción de gpG-his en medio condicionado. La producción de gpG fue determinada mediante western blot (bandas superiores).....	50
Figura 15. Efecto de la densidad celular al momento de infección en la producción de gpG-his en medio fresco.....	50
Figura 16. Linealización de la fase exponencial de crecimiento de las células Sf-9 en el Biorreactor Biostat B plus.....	53
Figura 17. Determinación de la producción de glicoproteína G en dos sistemas de cultivo: en el biorreactor Biostat B plus (B) y en el matraz (M). Los subíndices (1 y 2) indican un primer y segundo ensayo respectivamente. La detección de proteína se realizó mediante <i>western blot</i> empleando un anticuerpo monoclonal anti-his.....	56
Figura 18. Producción de gpG-his en células Sf-9 infectadas con el baculovirus BV-gpG en el biorreactor Biostat B plus. La cuantificación de la proteína ($\mu\text{g/mL}$) fue determinada mediante un ELISA sandwich.	56
Figura 19. Placa utilizada para la titulación del baculovirus. Donde 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} son las diluciones del baculovirus colocadas en cada pocillo para la infección de células Sf-9 y CN, el control negativo (células Sf-9 sin infectar).....	82
Figura 20. Puesta en funcionamiento del Biorreactor Biostat B plus-cc twin. Se muestra la torre control y dos recipientes con cultivo de células Sf-9.....	87
Figura 21. Pantalla de control de parámetros operacionales en el Biorreactor Biostat B plus-cc twin. Se observa dos configuraciones diferentes para cada cultivo. Al lado izquierdo, cultivo mantenido a 140 rpm. Al lado derecho, cultivo mantenido a 170 rpm.....	88
Figura 22. Pantalla mostrando el comportamiento en tiempo real de las variables: O_2 , temperatura, pH y velocidad de agitación en el cultivo (lado izquierdo).....	88

RESUMEN

El Virus de la Laringotraqueitis Infecciosa (VLTi) es responsable de una importante enfermedad respiratoria en aves. La glicoproteína G (gpG) es un factor de virulencia en el VLTi, identificada como una proteína viral de unión a quimioquinas (CKBP) capaz de unirse a quimioquinas de aves y de otras especies modulando su actividad. Esto hace de la gpG una proteína de interés científico y comercial, requiriéndose, por lo tanto, tener suficiente cantidad de proteína disponible para futuros estudios funcionales y estructurales. Este trabajo describe un método para la producción de gpG recombinante del VLTi en un biorreactor de tanque agitado, infectando la línea celular de *Spodoptera frugiperda* Sf-9 con el baculovirus BV-gpG. Para este fin, fue necesario una caracterización previa del crecimiento de las células Sf-9; a su vez, optimizar la producción de gpG a pequeña escala y finalmente, definir parámetros operacionales en el biorreactor Biostat B plus que aseguren un ambiente hidrodinámico adecuado para el crecimiento e infección de las células.

Las células Sf-9 mostraron una velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{\max}) de 0,026/h, un tiempo de doblaje poblacional (TDP) de 27 horas y una densidad celular máxima de $8,7 \times 10^6$ cel/mL. A pequeña escala, la producción de gpG fue mayor al cosechar las células a las 72 horas post infección (hpi) independientemente de la multiplicidad de infección (MOI) empleada en el rango de 1,2 a 20. Una mayor producción de gpG fue obtenida al infectar las células durante la fase de crecimiento exponencial temprana comparada a la fase de crecimiento exponencial tardía. La densidad óptima de infección varió en dependencia del empleo de medio condicionado (2×10^6 cel/mL) o de medio fresco (7×10^6 cel/mL). En el manejo del biorreactor, se observó que el empleo de una velocidad de agitación de 170 rpm, una tasa de aireación de 0.04 vvm y un valor de pO_2 de 40%, mostraron que las células Sf-9 no fueron sensibles a un estrés de corte de 0.38 N/m^2 a un valor de número de Reynolds alto (20×10^4) en condiciones de aireación por *sparger*. Una eficiente producción de gpG en 3,5 L de biorreactor fue lograda infectando el cultivo en fase de crecimiento exponencial, a una densidad de 2×10^6 cel/mL, un MOI de 2 y cosechado a las 72 hpi. Mediante un ELISA *sandwich* se logró cuantificar el rendimiento volumétrico de gpG his, el cual fue de 3.66 mg/L, lo que representa un aumento de 2 *fold* comparado a la producción en el matraz. Los resultados demuestran la factibilidad de producir glicoproteína G en células de insecto infectadas con un baculovirus a escala de biorreactor.

Palabras Clave: Baculovirus, células de insecto, biorreactor, glicoproteína G, Virus de la Laringotraqueitis Infecciosa aviar (VLTi), infección.

ABSTRACT

Infectious Laryngotracheitis virus (ILTV) causes an important respiratory disease in poultry. Glycoprotein G (gpG) is a virulence factor in ILTV that was identified as a viral chemokine binding protein (vCKBP) with the ability to bind chemokines from chickens and other species and modulate their activity. To further study the functional and structural characteristics of gpG, it is important to have enough quantities of protein available. This thesis describes a method for the production of VLT-encoded gpG in a stirred tank, expressed in an insect cell line of *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) after infection with baculovirus BV-gpG. For this purpose, it was necessary a previous characterization of Sf-9 cells growth and the optimization of gpG production on a small scale. After that, we defined operational parameters in the Biostat B plus bioreactor to ensure the optimal hydrodynamic environment in order to guarantee cells growth and infection.

The cellular growth of Sf-9 was characterized, registering a specific growth rate (μ_{\max}) of 0.026/h, a population doubling time (PDT) of 27 hours and a maximum cell density of 8.7×10^6 cel/mL. Shake flask studies such as multiplicity of infection (MOI), harvest time, time of infection and density of infection were conducted to assess conditions to be used in bioreactor. gpG production was higher when the cells were harvested at 72 hpi and independent of the multiplicity of infection (MOI) used in the range from 1,2 to 20. The Sf-9 cells that were infected in an early exponential phase showed a greater production than cells infected in late exponential phase. The optimal peak cell density at infection varied depending on the use of conditioned medium (2×10^6 cells/mL) or fresh medium (7×10^6 cells/mL). On the bioreactor, was observed that using at agitator speed of 170 rpm, at aeration rate of 0.04 vvm and at a pO₂ of 40%, the cellular integrity was not affected by shear stresses of 0.38 N/m² with a Reynolds number of 20×10^4 in sparging condition. At 3,5 L bioreactor scale an efficient production was achieved by infecting the culture on exponential phase at a concentration of 2×10^6 cells/mL using a MOI of 2 pfu per cell and harvesting the cells 72 hpi. Using a ELISA sandwich, a volumetric yield of gpG was determined, it was 3,66 mg/L and it is 2-fold higher than yield of shaker flask. This data demonstrates the feasibility of gpG production by insect cells infected with baculovirus on a bioreactor scale.

Keywords: baculovirus, insect cells, glycoprotein G, Infectious Laryngotracheitis virus (ILTV), infection.

LISTA DE ABREVIATURAS

AcMNPV	Virus de la nucleopoliedrosis múltiple de <i>Autographa californica</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BEVS	Sistema de expresión vector de baculovirus
BSA	Albumina de suero bovino
BVs	Virus brotantes
CKBPs	Proteínas de unión a quimioquinas
gp	Glicoproteína
gpG	glicoproteína G
GVs	Granulovirus
HRP	Peroxidasa de rabano
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
kDa	kilo Dalton
LdMNPV	Virus de la nucleopoliedrosis múltiple de <i>Lymtria dispar</i>
LTI	Laringotraqueitis Infecciosa
mL	mililitro
MOI	Multiplicidad de infección
MPTs	Modificaciones postraduccionales
NPVs	Virus de la nucleopoliedrosis
ODV	Virus derivados de cuerpos de Oclusión
ORF	Marco de lectura abierto
pb	pares de bases
PBS	<i>Buffer</i> Fosfato Salino
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SFB	Suero Fetal de Bovino
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TEMED	Tetrametiletildiamina
µg	microgramos
µL	microlitros
µm	micrómetros
VHS	Virus del Herpes Simple
VLTi	Virus de Laringotraqueitis Infecciosa
vvm	volumen de gas, por volumen de medio por minuto

I. INTRODUCCIÓN

La producción de proteínas recombinantes ha tenido un aumento marcado en los últimos años. Drogas terapéuticas y productos de diagnóstico basados en péptidos, anticuerpos monoclonales, vacunas recombinantes, vienen cubriendo un mercado biotecnológico cada vez más grande (Chu y Robinson, 2001). Esto ha permitido la búsqueda de diferentes sistemas de expresión como el sistema bacteriano (principalmente, el de *Escherichia coli*), el de levaduras, el de células de insecto y el de células de mamíferos (Ram *et al.*, 2016), que aseguren un alto rendimiento de la proteína sin que se vea alterada su actividad biológica.

El sistema de expresión a utilizar depende de la naturaleza de la proteína; uno de los más utilizados es el sistema de *Escherichia coli* por su bajo costo de mantenimiento y alto rendimiento de producción (Huang *et al.*, 2012); sin embargo, debido a que es un organismo procariota, no puede realizar modificaciones postraduccionales (MPTs) que son fundamentales para el correcto funcionamiento de la proteína sintetizada por organismos eucariotas (Walsh y Jefferis, 2006). Uno de los sistemas más utilizados actualmente, es el sistema basado en Células de Insecto-Baculovirus que, a diferencia del sistema bacteriano, es capaz de realizar modificaciones seguidas a la traducción que permiten obtener proteínas biológicamente activas (Ailor y Betenbaugh, 1999). Entre las ventajas que ofrece este sistema es su fácil manejo, ya que las células de insecto se adaptan muy bien al cultivo en suspensión, es un sistema seguro, debido a que la infección por baculovirus se restringe a insectos y, además, este sistema brinda facilidad para escalar la producción.

Para producir proteínas recombinantes a gran escala empleando el sistema de Células de Insecto-Baculovirus, es importante definir 4 parámetros: las células de insecto hospederas, el medio de cultivo, el diseño del baculovirus que porta el gen de interés y las condiciones de operación del biorreactor. La primera línea celular ampliamente utilizada fue la Sf-21, aislada desde el ovario de *Spodoptera frugiperda*. La Sf-9, un clon

de la Sf-21, ha ido reemplazando a las células Sf-21, debido a que presenta mejores características de crecimiento celular y producción (Vaughn *et al.*, 1977). Por otro lado, el medio de cultivo es otro factor clave en el éxito de producción, un medio de bajo costo y que a la vez asegure un alto rendimiento de producción es ideal para los procesos industriales, por ello, se ha masificado la utilización de medios libre de suero para este sistema. El baculovirus utilizado con mayor frecuencia como vector es una modificación del Virus de la nucleopoliedrosis múltiple de *Autographa californica* (AcNPV, del inglés *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus*), el cual es específico de insectos del orden Lepidoptera, siendo las células derivadas de *Spodoptera frugiperda*, de *Trichoplusia ni* y de *Helicoverpa virescens* las más susceptibles (Groener, 1989). Asimismo, a nivel biotecnológico, las condiciones de operación del biorreactor, juegan un papel crucial en la producción óptima de proteína recombinante. En el caso de los biorreactores agitados, los parámetros a considerar, principalmente, son los niveles de oxígeno disuelto, la temperatura, la agitación, la tasa de flujo de gas y el pH.

En tal sentido, es preciso caracterizar la interacción de un baculovirus específico con una línea celular en un medio de cultivo dado, para lo cual es necesario, una evaluación previa de ciertas condiciones a pequeña escala como son la multiplicidad de infección (*MOI*, del inglés *Multiplicity of Infection*), la fase de crecimiento celular al momento de infección, la densidad celular al momento de infección, el tiempo de cosecha, así como estrategias de sembrado e infección que permitan un rendimiento óptimo de la proteína; y además para garantizar la producción a gran escala, se tiene que tener en cuenta las condiciones de operación del biorreactor, niveles de oxígeno, depleción de nutrientes y acumulación de productos de desecho.

La glicoproteína G (gpG) es una proteína codificada por el Virus de la Laringotraqueítis Infecciosa aviar (VLTi) y que es secretada fuera de las células infectadas. El VLTi, miembro de la subfamilia de alphaherpesvirus, es responsable de causar la enfermedad

de la Laringotraqueitis Infecciosa en aves, la cual ocasiona importantes pérdidas económicas en el Perú y en el mundo (Alvarado *et al.*, 2013).

Una investigación previa postuló a la glicoproteína G como un factor de virulencia en el VLTl (Devlin *et al.*, 2006), mostrando que la delección de la gpG del genoma del VLTl no afecta la capacidad de replicación del virus en las aves, sin embargo, se presenta una atenuación marcada de los signos clínicos comparado a la infección con el virus *wild type*. En el año 2010, otro estudio identificó a la gpG como una proteína viral de unión a quimoquinas (CKBPs, del inglés *chemokine binding-protein*) (Devlin *et al.*, 2010). Devlin *et al.* mostraron que la gpG recombinante del VLTl es capaz de unirse a diferentes receptores de quimoquinas recombinantes tanto en humanos como en ratones. Además, la glicoproteína G del VLTl ha sido clasificada dentro del grupo IV de CKBPs virales que agrupa sólo a isoformas de la gpG de alphaherpesvirus capaces de unirse a receptores de quimoquinas del huésped e inhibir su función. Debido al carácter inmunomodulador de las CKBPs y la diferencia estructural con respecto a los receptores de quimoquinas del hospedero, se plantea el empleo de CKBPs como biofarmacéuticos para tratar enfermedades con trastornos del sistema inmune (Lucas y McFadden, 2017). Así mismo, la CKBP del grupo I ha mostrado atenuar efectivamente el rechazo del sistema inmune en aloinjertos en ratas (Bédard *et al.*, 2003)

Por lo expuesto líneas arriba, se postula a la glicoproteína G del VLTl como una proteína de interés para el campo biotecnológico; por lo tanto, la producción de dicha proteína en un biorreactor agitado permitirá la realización de futuros ensayos tanto estructurales como funcionales de la misma.

En el presente trabajo se realizó la producción intracelular de glicoproteína G recombinante del VLTl en un biorreactor agitado, utilizando la línea celular Sf-9, mantenida en suspensión en medio libre de suero y el baculovirus como vector de expresión.

II. MARCO TEÓRICO-CONCEPTUAL

2.1 Virus de la Laringotraqueitis Infecciosa aviar

2.1.1 Laringotraqueitis Infecciosa

La Laringotraqueitis Infecciosa (LTI) es una enfermedad causada por el Virus de la Laringotraqueitis Infecciosa aviar (VLTi) que afecta el tracto respiratorio superior de los pollos, ocasionando importantes pérdidas económicas en el sector avícola debido a que produce retardo en el crecimiento de las aves, disminución de la producción de huevos e incluso, la muerte.

El principal órgano afectado es la tráquea, pudiendo verse afectada también, la laringe, conjuntiva, intestino y sacos aéreos. Entre los principales signos de la enfermedad, tenemos: descarga nasal, conjuntivitis, tos, ronquera, expectoración de moco sanguinolento y disnea (Broerman y Edgington, 1931)

Para la prevención de la enfermedad se han utilizado vacunas de virus vivos atenuados mostrando una efectividad cercana al 100%; sin embargo, un porcentaje de las aves vacunadas pueden desarrollar la enfermedad en etapas más tardías e incluso una nueva población de aves puede ser afectada por la transmisión horizontal del virus que permaneció en un estado de latencia en las aves vacunadas (Bagust, 1986; Andreasen *et al.*, 1989)

En el Perú, un estudio en el año 2013, mostró el impacto económico causado por la Laringotraqueitis Infecciosa en una población de gallinas comerciales ponedoras en Chilca-Lima, en dicho estudio se observó que el porcentaje de mortalidad aumentó en un 18% y que la producción de huevos se redujo en un 16% con respecto a la población de gallinas sin la enfermedad (Alvarado *et al.*, 2013).

2.1.2 Clasificación, estructura y organización del genoma del VLTi

El VLTi o *Gallid alphaherpesvirus 1* pertenece a la familia Herpesviridae, a la subfamilia Alphaherpesvirinae y al género Iltovirus. Dicho virus posee un genoma de

ADN lineal, de doble cadena contenido en una nucleocápside icosaédrica. Una característica de esta familia es que posee una capa de tegumento proteico, la cual cubre al virión. Toda la partícula viral se encuentra cubierta, a su vez, por una envoltura externa, una membrana lipídica que está asociada a diferentes glicoproteínas virales (Fauquet *et al.*, 2005).

El genoma de *Gallid alphaherpesvirus* posee 150 mil pb y está organizada en dos segmentos, una secuencia de repetición única larga (UL) y otra secuencia de repetición única corta (US), esta última región, está flanqueada por secuencias invertidas repetidas de diferentes tamaños. A su vez, el genoma posee 76 *ORFs*, probablemente todos codificantes, de los cuales, 63 son homólogos a los encontrados en el Virus del Herpes Simple tipo 1 (VHS-1) y de estos, 11 son responsables de codificar glicoproteínas homólogas del VHS-1, como las glicoproteínas B,C, D, E, G, H, I, J, K, L y M (Fuchs *et al.*, 2007).

2.1.3 Identificación de proteínas virales inmunogénicas

Las proteínas candidatas a ser inmunomoduladoras son las glicoproteínas presentes en la envoltura viral. Su detección se ha basado en el uso de anticuerpos monoclonales y mono-específicos en ensayos de *Western Blot*, inmunohistoquímica, radioinmunoprecipitación, inmunofluorescencia indirecta, ELISA, entre otros.

Las glicoproteínas mejor caracterizadas hasta ahora, son la glicoproteína C (gpC) y la glicoproteína J (gpJ), productos de los genes UL44 y US5, respectivamente. La glicoproteína C, de un peso observado de 60 kDa, tiene un papel en la adherencia inicial del virus a la membrana del hospedero, uniéndose a los residuos de heparan sulfato de los proteoglicanos presentes en la membrana del huésped (Whitley y Roizman, 2001). La glicoproteína J, por su parte, ha mostrado ser la proteína de superficie más inmunogénica (Wild *et al.*, 1996). Dicha proteína es producto del gen ORF5 dentro de la región US del genoma viral, y curiosamente, se ha detectado que

tiene 4 pesos moleculares diferentes: de 85 kDa, 115 kDa, 160 kDa y 200 kDa. Su función, hoy en día, no se ha determinado con precisión.

2.1.3.1 Glicoproteína G

Otra proteína bien conservada es la glicoproteína G (gpG), producto del gen US4, de un tamaño predicho de 31,7 kDa y una masa aparente de 52 kDa (Fuchs *et al.*, 2007). La glicoproteína G, a diferencia de las glicoproteínas ya mencionadas, no se encuentra presente en la estructura del virus, sino que es secretada por las células infectadas, por lo que se le atribuye una función inmunomoduladora durante la infección del VLTl.

En el año 2003, se identificó que isoformas de la gpG de la subfamilia de alphaherpesvirus constituían un grupo particular de proteínas virales de unión a quimioquinas (Bryan *et al.*, 2003). Dichas CKBPs no presentaban similitud de secuencias con los receptores de citoquinas del huésped; sin embargo, eran capaces de unirse a un amplio espectro de quimioquinas (C, CC, CXC) inhibiendo su unión con receptores específicos del hospedero; y además, la gpG también se unía a glicosaminoglicanos los cuales son necesarios para una correcta presentación y función de las quimioquinas *In Vivo*.

Devlin *et al.*, en el año 2006, realizaron un estudio a fin de evaluar el papel de la gpG del VLTl en el desarrollo de la enfermedad de la LTI. Utilizando un VLTl incapaz de expresar la glicoproteína G, demostraron que el crecimiento del virus mutante tanto en cultivos celulares como en la mucosa traqueal del ave no se ve afectado; sin embargo, la intensidad de signos clínicos en las aves infectadas con el genotipo mutante se redujo de manera considerable con respecto a las aves infectadas con el VLTl *wild type* (Devlin *et al.*, 2006).

En el año 2010, otro estudio mostró que la gpG del VLTl era capaz de unirse a quimioquinas recombinantes de humanos y ratones con una afinidad similar a la

unión de quimioquinas con sus receptores específicos; y que además, dicha unión inhibía la quimiotaxis leucocitaria (*Devlin et al.*, 2010). Así mismo, al evaluar la respuesta inmunológica del ave infectada con el VLTi deficiente de gpG se observó que una respuesta celular, a diferencia de una respuesta humoral, se ve favorecida frente a la infección con el VLTi deficiente de gpG.

Las isoformas de la gpG han sido clasificadas dentro de un nuevo grupo de CKBPs virales, el grupo IV. Las CKBPs representan proteínas de interés por su capacidad de alterar la función de quimioquinas y el tráfico leucocitario. Dicha característica, muestra la posible capacidad terapéutica de las CKBPs para tratar enfermedades autoinmunes y, también, para disminuir el rechazo del sistema inmune frente a tejidos trasplantados (Lucas y McFadden, 2004).

2.2 Sistemas biológicos de producción de proteínas recombinantes

Uno de los sistemas más utilizados para la producción de péptidos es el sistema bacteriano, como el de *Escherichia coli* (*E.coli*), que debido a su corto tiempo de duplicación y bajo costo de mantenimiento del cultivo, permiten una rápida producción de la proteína deseada con bajos costos (Huang *et al.*, 2012). Sin embargo, hay limitaciones importantes del sistema de *E.coli* como es la imposibilidad de realizar uniones de puente disulfuro para el ensamblaje de proteínas complejas, no pudiendo, tampoco, glicosilar las proteínas sintetizadas (Walsh y Jefferis, 2006).

También, se emplean líneas celulares immortalizadas de mamíferos en la manufactura de proteínas terapéuticas recombinantes para humanos debido a que tienen patrones de glicosilación muy similares, entre estas líneas se incluyen, el mieloma de ratón (NS0), las células derivadas del ovario de hámster chino (CHO) y las células derivadas del riñón de hámster recién nacido (Butler y Spearman, 2014). Por ejemplo, muchas compañías usan ampliamente las células *Madin Darby Canine Kidney* (MDCK) y *African Green monkey kidney Vero cells* (Vero) para la producción de vacunas; sin

embargo, el problema de éstas radica en que al ser líneas celulares adherentes requieren de una superficie para su crecimiento, complicando así el proceso de escalabilidad y el costo de mantenimiento.

Dentro de la tecnología basada en el cultivo celular, las células de insecto representan un importante candidato para la obtención de proteínas de forma rápida, segura y masiva, ya que además de su capacidad de realizar MPTs, tienen tiempos de duplicación cortos, y su cultivo es escalable fácilmente, permitiendo una rápida producción. Para la expresión de la proteína de interés, se utiliza como vector un baculovirus, el cual debido a las características de su genoma permite la inserción de un rango amplio de proteínas. En conjunto, a este sistema de producción se le conoce como el sistema de Baculovirus - Células de insecto o simplemente como BEVS (*Baculovirus Expression Vector System*).

Hasta el año 2015, empleando la plataforma de manufactura de células de insecto y baculovirus como herramienta biotecnológica, se han producido vacunas, proteínas terapéuticas, partículas similares a virus, y otros productos que hoy en día cuentan con licencia para su uso comercial. Se aprobaron 9 productos para uso humano, como la vacuna contra la Influenza (Flublox®), la vacuna contra el Virus del Papiloma Humano (Cervarix®), proteína terapéutica contra el Cáncer de próstata (Provenge®), entre otros; se aprobaron 5 vacunas para uso veterinario como Porcilis® Pesti y BAYOVAC CSF E2®, ambas empleadas para combatir el Cólera Porcino. Asimismo, hoy en día, existen más de 20 productos, a ser empleados como Vectores Virales adeno-asociados, que se encuentran en diferentes fases de evaluación para ser utilizados comercialmente en el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, cáncer gástrico, artritis inflamatoria y demás (Felberbaum, 2015).

2.3 Plataforma de producción de proteínas recombinantes utilizando el sistema de Células de Insecto-Baculovirus

En los últimos 30 años, el sistema de expresión Células de Insecto-Baculovirus se ha convertido en uno de los sistemas más utilizados para la producción de proteínas recombinantes. El baculovirus, fue utilizado inicialmente como agente de control biológico en el campo agrícola, hoy en día es una herramienta biotecnológica capaz de infectar células de insecto, e incluso, transducir células de mamíferos para la expresión de proteínas foráneas; mientras que, las líneas de células de insecto han sido mejoradas para tener una vida media más larga, permitir la estabilidad de la proteína recombinante, e incluso, tener patrones de glicosilación y fosforilación que imiten las MPTs que sufren las proteínas en las células de mamíferos; estas mejoras han permitido que se utilice este sistema de expresión no solo a nivel de laboratorio sino que también sea utilizado a nivel industrial.

2.3.1 Baculovirus

2.3.1.1 Clasificación de los Baculovirus

Los baculovirus pertenecen a la familia Baculoviridae, estos afectan a la población de invertebrados, preferentemente a la de insectos, y agrupa a virus de ADN circular superenrollado de doble cadena. Clasificaciones anteriores de la familia Baculoviridae, basadas en la morfología de los cuerpos de oclusión, la dividían en dos géneros: Nucleopolyedrovirus (NPVs) y Granulovirus (GVs) (Van Regenmortel *et al.*, 2000). En el 2006, un estudio basado en el análisis de 29 secuencias genómicas de baculovirus, propuso la revisión de la taxonomía existente para establecer cuatro géneros dentro de esta familia: alphabaculovirus (NPVs específicos del orden lepidoptera), betabaculovirus (GVs específicos del orden lepidoptera), deltabaculovirus (NPVs específicos del orden hymenoptera) y gammabaculovirus (NPVs específicos del orden diptera) (Jehle *et al.*, 2006). El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, del inglés *International*

Committee on Taxonomy of Viruses) aceptó dicha revisión, y en el 2009, en el noveno reporte del ICTV, se definió que la familia Baculoviridae está dividida en los 4 géneros ya mencionados.

Los GVs (miembros del género betabaculovirus) se caracterizan por formar pequeños cuerpos de oclusión (OB, del inglés *Occlusion Bodies*) que encierran uno o dos viriones cubiertos por una proteína llamada granulina; mientras que los NPVs (agrupando a los alphabaculovirus, deltabaculovirus y gammabaculovirus) son capaces de formar grandes cuerpos de oclusión, compuestos de la proteína poliedrina, que pueden albergar muchos viriones (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

2.3.1.2 Estructura de los Baculovirus

El genoma del baculovirus de ADN circular, superenrollado y de doble cadena, se encuentra altamente condensando dentro de una nucleocápside. Su tamaño varía desde los 80 hasta 180 kDa y pueden codificar hasta 200 proteínas (Fauquet *et al.*, 2005).

Tanto los NPVs como las GVs, poseen dos tipos de progenies de baculovirus: Los virus brotantes (BV, del inglés *Budded Virus*) y los virus derivados de cuerpos de oclusión (ODV, del inglés *Occlusion-derived Virus*) los cuales son genéticamente idénticos (Smith y Summers, 1978).

Los virus brotantes, BV, poseen partículas similares a espigas, conocidas como peplómeros que están localizadas en la cubierta del virión compuestos por proteínas de fusión; en el caso del Virus de la nucleopoliedrosis múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV, del inglés *Autographa californica multiple nucleopolyedrovirus*) y otros alphabaculovirus, los peplómeros están formados por la glicoproteína gp64 (Volkman *et al.*, 1984). Durante la infección, gp64 se localiza en un área específica de la membrana plasmática del hospedero y es en ese punto donde los viriones emergen, incorporando dicha proteína en su envoltura viral (Blissard y Rohrmann, 1989). Los betabaculovirus y otros alphabaculovirus

carecen de dicha proteína de fusión pero codifican la proteína F, un homólogo de la proteína de fusión de envoltura LD130 de *Lymantria dispar* MNPV (LdMNPV). Los virus derivados de cuerpos de oclusión (ODVs), por su parte, carecen de la glicoproteína gp64 y LD130, pero codifican las proteínas P74, PIF-1, PIF-2, PIF-3, AC96 (PIF-4) and ODV-E56 (PIF-5) relacionada con la parte externa del virus que son esenciales para la infectividad oral del virus (Fauquet *et al.*, 2005).

2.3.1.3 Organización del genoma y expresión de genes del baculovirus

El secuenciamiento del genoma completo de AcMNPV ha revelado más de 150 genes. De estos, 30 son compartidos entre todas las subfamilias de baculovirus, llamados genes “*core*”, mientras que 60 genes son compartidos dentro de la subfamilia de Alphaherpesvirus, involucrados en la replicación del ADN viral, expresión de genes tardíos y de la estructura del virion (Fauquet *et al.*, 2005).

La expresión de genes es regulada temporalmente, identificándose 3 fases (fase temprana, tardía y muy tardía) involucrando genes que no se encuentran formando “*cluster*” en el genoma. Durante la fase temprana, también conocida como fase de síntesis viral, el virus prepara a la célula para la replicación del ADN viral. Se produce inmediatamente después del inicio de la infección celular, entre las 0 y 6 primeras horas. Se identifican dos grupos de genes dentro de esta fase, genes de expresión temprana inmediata, que se expresan en ausencia de síntesis de proteína *de novo*, y genes de expresión temprana retardada. Los genes en esta fase del ciclo de vida del baculovirus son transcritos por la ARN polimerasa II del huésped y están involucrados en la adherencia, penetración, remoción de la cápside y apagado de genes del hospedero (Rohrmann, 2013). Los genes tardíos y muy tardíos, por el contrario, son transcritos por la ARN polimerasa del propio virus. En la fase tardía, también conocida como fase de estructura viral, genes tardíos son expresados para la replicación del ADN viral y el ensamblaje del virus. Ocurre entre las 6 y 12 horas posterior a la infección, donde la célula inicia la

producción de virus brotantes (Rohrmann, 2013). En la fase muy tardía, también conocida como fase de proteína de oclusión viral, los genes p10 y polihedrina son expresados. Se forman los cuerpos de oclusión e inicia la lisis celular. Ocurre entre las 24 y 96 horas posteriores a la infección, donde múltiples viriones son producidos y son cubiertos por una matriz cristalina de poliedra (Kelly *et al.*, 2007).

2.3.1.4 Baculovirus como vector de expresión

El baculovirus empleado como vector de expresión, tiene dos características principales. La primera es que los genes de poliedrina y p10 que son expresados en una fase muy tardía de infección *In vivo* para la formación de cuerpos de oclusión, no están involucrados en la replicación viral, por lo tanto, su expresión no es necesaria para que se den rondas de infección viral en un cultivo celular, en donde sólo se producen BVs (Smith *et al.* 1983). Esto ha permitido el reemplazo de los genes de poliedrina y p10, por el gen de la proteína de interés sin afectar la replicación viral. La segunda característica es que los promotores de dichos genes, poliedrina y p10, son promotores muy fuertes y permiten la producción de grandes cantidades de proteínas recombinantes en células de insecto (Emery y Bishop, 1987; Belyaev *et al.*, 1993).

Los primeros esfuerzos en producir baculovirus recombinantes se realizaron utilizando procesos de recombinación homóloga poco eficientes, se cotransfectaron células de insecto con baculovirus *wild-type* y un plásmido donador (conteniendo al gen de interés); posterior a la recombinación homóloga, el gen de interés reemplazó al gen de poliedrina, generándose virus recombinantes negativos de poliedrina y virus parentales capaces de formar cuerpos de oclusión; sin embargo, la tasa de producción de virus recombinantes era inferior al 0,1%. Posteriormente, para eliminar la infectividad de los baculovirus parentales formados, se linealizó el ADN circular de AcMNPV, obteniéndose tasas de recombinantes superiores al 30%; sin embargo, la recirculación del ADN *wild-type*

producía aún una alta frecuencia de baculovirus parentales, dificultando el aislamiento de los virus recombinantes por ensayo en placa (Kitts *et al.*, 1990) En posteriores estudios, se modificó el ADN viral, insertando el gen LacZ en lugar del gen de poliedrina e insertando diferentes sitios de corte que comprometían un gen esencial para la replicación del virus (vector BacPAK 6) ; por lo tanto, aunque se produjese una recirculación, el virus parental no sería infectivo, mejorando la frecuencia de obtención de virus recombinantes hasta tasas cercanas al 100%; sin embargo, aún era necesario la purificación de la clona mediante ensayos en placa para asegurar la presencia del baculovirus recombinante (Kitts y Possee, 1993).

En un esfuerzo por eliminar el ensayo en placa como método para el aislamiento del baculovirus de interés, Leush y Lee diseñaron un sistema de selección del vector recombinante basado en la transposición específica de sitio del gen de interés desde un plásmido donador hacia el ADN clonado del baculovirus o “bacmid”, utilizando la bacteria *Escherichia coli* como portador del genoma modificado del baculovirus (Leush y Lee, 1995). Este sistema de generación de baculovirus recombinante es conocido comercialmente como *Bac-to-Bac*. El “bacmid” contiene un mini F replicon, genes de selección de resistencia a antibiótico, un sitio de transposición Tn7 y un gen LacZ, en lugar del gen de poliedrina; el plásmido donador, por su parte, contiene el gen de interés bajo el dominio del promotor de poliedrina, flanqueados por sitios de transposición Tn7. El plásmido donador es utilizado para transformar la población de clones de la bacteria *E.coli*; posteriormente, dentro de la bacteria se realiza un proceso de transposición entre los sitios Tn7 del plásmido donador y del bacmid facilitado por la función transposasa de un plásmido ayudador dentro de *E.coli*, permitiendo la inserción del gen de interés, bajo el dominio del promotor de poliedrina, en el bacmid. Las bacterias que contienen el bacmid con el gen de interés son

fácilmente seleccionadas y después de un proceso de extracción de ADN, se transfecta células de insecto para la generación de baculovirus floridos o brotantes (BVs).

2.3.2 Células de insecto

A inicios del siglo XX, se tenían escasos avances en la utilización de células de insecto como una herramienta biotecnológica de cultivo *In vitro*. Los experimentos de la época utilizaban una simple solución salina o hemolinfa como medio de cultivo para las células aisladas, haciendo que el cultivo solo pueda ser mantenido por pocos días. Un punto de quiebre fue establecido cuatro décadas después, cuando Grace (1962) exitosamente logró establecer cultivos de células de insecto de largo plazo (Grace, 1962). Desde esa fecha, se han establecido más de 260 líneas de células continuas desde más de 50 especies diferentes de insectos del orden Lepidoptera (Lynn, 1999). Las primeras líneas continuas fueron utilizadas a gran escala para la producción de baculovirus *wild-type*, como agentes bioinsecticidas, pero después del desarrollo del Sistema de Expresión del Vector de Baculovirus, a inicios de los años 80s, surgió el interés de utilizar la tecnología del cultivo de células de insecto como una plataforma de manufactura de biológicos como proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales, vacunas, etc.

La primera línea celular en ser ampliamente utilizada fue la Sf-21, originada desde ovarios de *Spodoptera frugiperda*. La línea Sf-9, un clon de la Sf-21, con características de crecimiento y producción mejoradas, reemplazó progresivamente a la Sf-21 en el campo de investigación y producción (Hink, 1991); otra línea celular, la Tn-5, derivada de embriones de *Trichoplusia ni*, ha mostrado, tener una capacidad superior para la producción de proteínas recombinantes, pero no en todos los casos (Davis *et al.*, 1993). Hoy en día, en términos de accesibilidad y fácil manejo, la línea Sf-9 es aún la más utilizada tanto

para la generación de *stock* virales, como para la producción de proteínas recombinantes (Aucoin *et al.*, 2010).

2.3.2.1 Medio de cultivo

El crecimiento de las células de insecto requiere de un ambiente que favorezca su proliferación fuera del tejido de origen. En sus inicios, las células de insecto fueron cultivadas en un medio basal, tal como medio Grace, suplementado con 5 a 10% de suero fetal de bovino (Grace, 1962); sin embargo, dado el progreso de BEVS en la industria biotecnológica, surgió la necesidad de emplear componentes de bajo costo, reemplazando el suero fetal bovino por suplementos tales como hidrolizados de proteínas que contienen complejos de oligopéptidos y polipéptidos, aminoácidos, emulsiones de lípidos que soportan un buen crecimiento, aseguran un alto rendimiento de baculovirus y una fuerte expresión de proteínas recombinantes.

Desde los años 80's, la formulación de IPL-41 se ha utilizado como un medio libre de suero basal al igual que el medio TNM-FH, ambos medios han mostrado soportar cultivos a gran escala al ser suplementados con extracto de levadura y una mezcla de lípidos emulsificados en Pluronic F-68 (Maiorella, *et al.*, 1988; Hink, 1991). En la composición de los medios libres de suero, por lo general, se emplea la glucosa como principal fuente de carbono. La glutamina, aunque no ha mostrado ser esencial para las células Sf-9 y Sf-21, es utilizada como suplemento (Öhman, *et al.*, 1996) y sustancias especializadas como surfactantes y agentes protectores del daño mecánico y/o químico también son empleadas en el cultivo en suspensión. Otra característica importante en la composición del medio es el empleo de *buffer* fosfato para mantener el pH, lo cual simplifica el mantenimiento del cultivo cuando es comparado al cultivo de células de mamíferos que emplean *buffers* carbonato y por tanto, requieren ser incubados con CO₂. El lactato, por lo

general, no es acumulado durante el crecimiento, excepto bajo condiciones limitantes de oxígeno.

En la actualidad, entre los medios libres de suero comerciales utilizados con mayor frecuencia tenemos al medio Sf-900 II (Weiss *et al.*, 1990), al Express Five SFM (Godwin *et al.*, 1995), Insect-XPRESS, EX – Cell 400 (Godwin *et al.*, 1989), EX – Cell 405 y EX – Cell 420 (Barnett, 1998). Todos los medios mencionados han mostrado ser capaces de soportar altas densidades celulares (rango de 10^6 a 10^7 cel/mL), prolongar la duración de la fase estacionaria y permitir obtener altos títulos de proteína; sin embargo, no se proporcionan los detalles de su composición, dificultando su adaptación para el análisis metabólico y cinético cuando se quiera optimizar el proceso, teniendo que valorarse la relación costo-beneficio al ser empleado a una escala industrial.

2.3.2.2 Crecimiento y metabolismo celular

Las células Sf-9 crecen de forma óptima a 27 y 28 grados centígrados y no requieren CO₂. En un cultivo *batch*, muestran un comportamiento típico de crecimiento a través de 4 fases (Pirt, 1975): fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte celular. La fase de latencia se entiende como el periodo de acondicionamiento de las células a las nuevas condiciones de cultivo; esta fase generalmente está ausente cuando las células son subcultivadas desde la fase exponencial. Durante la fase estacionaria, la tasa neta de crecimiento es cero, es decir, la tasa de crecimiento es igual a la tasa de muerte celular y durante la fase de muerte celular, hay un exceso de la tasa de muerte celular frente a la tasa de crecimiento y por lo tanto, un declive del número de células viables.

La tasa específica de crecimiento (μ) ha mostrado una variabilidad desde 0,022/h hasta 0,033/h, mientras que el tiempo de doblaje poblacional ha variado desde 21 h hasta 31,5 h ((Kamen *et al.*, 1995). Por último, la máxima densidad celular

alcanzada en un cultivo *batch* varía ampliamente en dependencia de la composición del medio y condiciones de cultivo, pudiendo exceder el valor de 10^7 cel/mL, en algunos casos (Schmid, 1996).

El metabolismo celular involucra la caracterización del crecimiento celular en base al consumo de nutrientes y obtención de productos y bioproductos. El consumo de nutrientes y entrega de productos, se definen por tasas específicas de utilización y producción, respectivamente. En un trabajo previo se encontró que la tasa de utilización específica de glucosa en células Sf-9 no infectadas fue de $-2,4 \times 10^{-17}$ mol.cel⁻¹.s⁻¹ y que además las células Sf-9, comparadas a las células Tn-5, no producen grandes cantidades de ion amonio y lactato si hay suficiente oxígeno disuelto (OD) en el cultivo (Rhiel *et al.*, 1997)

2.3.3 Producción en biorreactor utilizando BEVS

El Sistema de Expresión de Baculovirus como Vector (BEVS) es uno de los más utilizados para estudios de regulación de genes, de expresión de proteínas, de descubrimientos de drogas y producción comercial de partículas similares a virus, vacunas y drogas terapéuticas. Para muchas de estas aplicaciones se hace necesario desarrollar un proceso a gran escala que opere de una manera eficiente, robusta y reproducible, considerando el diseño del biorreactor y modo de operación. En el diseño del biorreactor y escalamiento para la producción de proteínas en células de insecto, se debe tener en cuenta dos puntos críticos. Primero, la necesidad de satisfacer los requerimientos de la respiración aeróbica de las células antes y después de la infección bajo las condiciones fisicoquímicas, mecánicas y geométricas impuestas en el biorreactor, mientras al mismo tiempo se salvaguarda la integridad de las células del estrés hidrodinámico impuesto. Y segundo, lograr la máxima productividad volumétrica de la proteína.

2.3.3.1 Tipo de biorreactores

El tipo de biorreactor es un aspecto importante en el desarrollo del proceso. Frecuentemente, dos tipos de biorreactores han sido los más utilizados para el cultivo de células de insecto: el tanque agitado (Van Lier *et al.*, 1990) y el biorreactor tubular (air-lift) (Mairoella *et al.*, 1988). Otro prototipo de biorreactor que también es empleado para el crecimiento de células de insecto, es el biorreactor tipo *Wave*, cuya principal característica es evitar el daño mecánico de células sensibles a la ruptura (Singh, 1999). Aunque los biorreactores tipo *air-lift* son más simples en el diseño y manejo, el sistema de reactor de tanque agitado está posicionado ampliamente en la industria, existiendo una mayor información sobre el diseño y principios de escalamiento, y por tanto, es la opción más utilizada actualmente.

□ Biorreactor de tanque agitado

Este sistema consiste en un recipiente cilíndrico con un eje central, accionado por un motor, que soporta uno o más agitadores (*impeller*). En dependencia del diseño del agitador o paleta se genera un flujo axial y/o radial del fluido en el sistema. La agitación garantiza la transferencia de masa, la mezcla y homogenización de la suspensión en el medio de cultivo. El aire y otros gases son añadidos al medio de cultivo bajo presión (aireación sumergida) a través de un dispositivo llamado “*sparger*”, lo cual permite transformar los gases de entrada en burbujas pequeñas que son distribuidas en todo el cultivo gracias a la rotación de las paletas. Los biorreactores de tanque agitado actuales cuentan, además, con un sistema de entrega de gases (aire, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono); un sistema de control del nivel de oxígeno disuelto en el medio; un sistema de control de temperatura; un sistema de control de pH; un sistema de control de espuma; puertos de muestreo, bombas para suministro de sustratos, entre otros.

Dichas características permiten que se realice un control preciso del proceso, pudiendo diseñar diversas estrategias de operación para optimizar el crecimiento del

cultivo y evaluar su escalabilidad en dependencia de las condiciones hidrodinámicas presentes en el proceso.

Sin embargo, pese a los beneficios mencionados, algunos de los principales problemas al utilizar un tanque agitado, es el daño celular asociado a la formación de burbujas en células sensibles a la aireación (Handa *et al.*, 1989) y también, el daño mecánico producto del empleo de altas tasas de agitación y aireación necesarios para mantener la demanda de oxígeno en el cultivo, ocasionando una fuerza de corte que se refleja en la caída de viabilidad de las células (Kioukia *et al.*, 1996).

☐ Biorreactor wave

Este sistema consiste de una bolsa desechable, previamente desinfectada, de uso único, colocada sobre una plataforma eléctrica oscilante. En la bolsa, entran en contacto el medio de cultivo y las células, y el resto de la cámara es llenado con aire (Singh, 1999). La base oscilante genera olas que aseguran la transferencia de oxígeno, la distribución de nutrientes y la suspensión de las células.

Utilizando este tipo de biorreactor, se cultivaron células Sf-9 en el modo *fed-batch* en un volumen de trabajo de 9 L, empleando un MOI de 0,5, se logró obtener un título de proteína de valor similar a lo obtenido en un matraz de 100 mL (Singh, 1999). En otro estudio se logró obtener títulos de proteínas similares tanto en el biorreactor tipo *Wave* como el de tanque agitado (> 100 mg/L); sin embargo, el costo operacional fue 40% menor para el biorreactor desechable (Weber *et al.*, 2001).

2.3.3.2 Modo de operación

Las células de insecto han crecido en diferentes tipos de biorreactores operados ya sea en modo *batch*, *fed-batch* o perfusión.

☐ Operación discontinua o por lotes (modo *batch*)

Es el modo de operación que se ha utilizado con mayor frecuencia en la producción de proteínas recombinantes utilizando BEVS. En el modo *batch*, las células son cultivadas a una concentración determinada y el proceso no es interrumpido por la adición de nutrientes, el producto se recupera al final del mismo. La operación discontinua es de fácil manejo, disminuyendo el riesgo de contaminación en el proceso; sin embargo, la densidad celular máxima alcanzada se limita a la disposición de nutrientes presentes en el medio de cultivo o a la acumulación de productos de desecho. En el caso del cultivo de células Sf-9 en matraces, se alcanza valores de 8×10^6 cel/mL, aproximadamente, utilizando medios comerciales libres de suero (Sf-9000 II, Insect-EXPRESS, Ex-cell 420, etc). Debido, a la limitación de nutrientes, las infecciones bajo este modo de operación, se realizan a densidades celulares inferiores a 3×10^6 cel/mL, ya que a densidades superiores se produce una disminución en el rendimiento específico de proteína; sin embargo, el reemplazo de medio antes de la infección permite infectar células a densidades mayores a 5×10^6 cel/mL alcanzando un mayor rendimiento volumétrico sin disminuir el rendimiento específico de producción (Lazarte *et al.*, 1992; Bedard *et al.*, 1994).

□ Operación semicontinua (modo *fed-batch*)

En un cultivo semicontinuo, se realiza una alimentación continua o semicontinua de nutrientes al sistema, pero el producto sólo es recuperado al final del proceso. En un cultivo *fed-batch* los nutrientes no limitan el crecimiento celular pero la acumulación de desechos sí podría ser una limitante. Debido a que las células de insecto presentan una mayor tolerancia a la alta osmolaridad y a la acumulación de bioproductos (en este caso, alanina) en comparación con las células de mamífero, el cultivo *fed-batch* se muestra como una estrategia de cultivo con bastante potencial para la producción de proteínas recombinantes utilizando BEVS.

Al utilizar este modo de operación, se debe considerar qué componentes deben ser añadidos, así como el método de su adición durante el proceso. En 1994, Bedard *et*

al., consiguieron obtener una mayor rendimiento de la proteína b-galactosidasa añadiendo un concentrado de aminoácidos y extracto de levadura (Bedard *et al.*, 1994). Asimismo, en 1997, su mismo grupo, logró alcanzar una densidad celular de 3×10^7 cel/mL utilizando una mezcla de diferentes nutrientes; en dicho trabajo se muestra que la tasa de producción específica de proteínas no se ve afectada incluso a densidades de 13×10^6 cel/mL al momento de infección (Bedard *et al.*, 1997). Similar resultado fue conseguido por Elías *et al.*, quienes lograron infectar células Sf-9, en un biorreactor agitado, a una densidad de 12×10^6 cel/mL con dos estrategias de alimentación diferentes, mostrando que el rendimiento de la proteína B-galactosidasa se vio favorecida sólo cuando se hizo un suministro gradual de los nutrientes; por el contrario, una adición de forma pulsada, no permitió aumentar el rendimiento de B galactosidasa (Elias *et al.*, 2000). En el 2010, utilizando un modo semicontinuo de operación con una solución de alimentación modificada a partir de lo descrito por Bedard en 1994, se logró aumentar hasta 3 *folds* el rendimiento volumétrico de la proteína hemaglutinina recombinante (rHA) en el cultivo de células *expressSF* (clones de Sf-9) en un biorreactor agitado (Meghroun *et al.*, 2009).

□ Operación por perfusión

Bajo este modo de operación hay una renovación constante de medio (nutrientes) y eliminación de bioproductos tóxicos a lo largo del proceso. Para poder realizar una remoción constante de medio, se hace necesario contar con dispositivos de retención celular que se integren en el biorreactor, haciendo del bioproceso un sistema más complejo. La producción de proteínas en biorreactores, utilizando el modo de perfusión, se divide en dos fases, una fase de crecimiento de células sanas hasta lograr altas densidades celulares, y otra fase de perfusión durante la infección, llamada fase de producción, en la que se evalúa el número de corridas que se puede realizar sin que caiga el rendimiento de producción. Una de las principales ventajas de un cultivo en perfusión es que se puede alcanzar densidades celulares realmente

altas sin que ocurra una disminución en el rendimiento de producción de proteínas; sin embargo, debido a la necesidad de dispositivos de retención, se añade un factor adicional de estrés en el cultivo que debe ser bien manejado para evitar problemas en la producción; dichos dispositivos, también pueden representar un problema al momento de llevar la producción a escalas mayores.

En volúmenes pequeños de producción, utilizando este modo de operación, el cultivo de las células Sf-21 ha llegado a alcanzar una densidad de 55×10^6 cel/mL, la máxima densidad reportada para cultivo de células de insecto (Deutschmann y Jäger, 1994). En otro trabajo, se infectaron células Sf-9 en biorreactores agitados de 4L de volumen de trabajo, a una densidad de 15×10^6 cel/mL, observando un rendimiento del 76% comparado a un sistema de perfusión en matraces (Caron *et al.*, 1994). Chico *et al.*, integrando un filtro de membrana en un biorreactor agitado en un cultivo de células High-Five, pudieron aumentar el rendimiento volumétrico de la glicoproteína “*trace-b*” hasta un valor mayor a 400 mg/L, una productividad máxima de 90 mg/L por día, lo que representa un aumento de dos *folds* comparado al valor máximo alcanzado utilizando el *spinner* (Chico y Jäger, 2000).

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Es posible producir la glicoproteína G recombinante del VLTl en un biorreactor agitado utilizando el sistema de expresión de baculovirus en células de insecto

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

Determinar la productividad de la glicoproteína G recombinante del Virus de Laringotraqueitis Infecciosa aviar en la línea celular Sf-9 infectada con el baculovirus “BV-gpG” cultivada en un biorreactor agitado.

3.2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar el crecimiento de las células Sf-9 mantenidas en suspensión empleando el medio libre de suero Ex-cell™ 420.
2. Optimizar las condiciones de infección de las células Sf-9 para la expresión de la glicoproteína G recombinante a nivel de laboratorio
3. Determinar los parámetros de control del Biorreactor Biostat B plus-cc Twin para el crecimiento de las células Sf-9.
4. Producir la glicoproteína G recombinante en el Biorreactor Biostat B-plus con un volumen de trabajo de 3,5 L.
5. Determinar la productividad volumétrica y específica de la glicoproteína G recombinante en el biorreactor Biostat B plus.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Material Biológico:

Línea celular Sf-9: Clon de la línea celular sf-21, aislada a partir del ovario de la larva de *Spodoptera frugiperda*. Las células Sf-9, adaptadas para el cultivo en suspensión, pertenecían al banco de células de la empresa FARVET S.A.C

Baculovirus BV-gpG: El *stock* de baculovirus fue proporcionado por la empresa FARVET S.A.C. El baculovirus fue diseñado utilizando el sistema Bac-to-Bac para la expresión intracelular de la glicoproteína G del virus de la Laringotraqueitis Infecciosa aviar en células de insecto Sf-9. La glicoproteína G recombinante fue asociada a residuos de histidina con un peso molecular de ~40kDa. A lo largo del presente trabajo se le denominará como “gpG-his”.

4.1.2 Insumos químicos

Se utilizó el medio comercial Ex-cell™ 420 (SAFC Biosciences, cat. no. 14420C).

4.1.3 Equipos y materiales de laboratorio

□ Biorreactor Biostat B plus-CC twin

Este reactor de tanque agitado, diseñado para el cultivo de células, consta de una torre o unidad de control y dos recipientes de cultivo con igual característica (Figura 1).

Unidad de control

- Un sistema DCU, permite la medición y regulación *online* de los parámetros del proceso (oxígeno disuelto, temperatura, agitación, tasa de flujo de gas, pH).
- Un módulo de gasificación “CC” optimizado para el cultivo de células, con entradas independientes de O₂, N₂, CO₂ (vía *sparger*) y aire (vía

sparger y *overlay*). La medición se controla a través de Controladores de Flujo Másico

- Un módulo de atemperamiento
- Módulos de bombas de manguera, para la adición de sustratos, ácidos, bases, etc.

Recipiente de cultivo

- Recipiente de vidrio UniVessel® Glass de pared doble, diseñado para ser atemperado mediante un circuito de agua a presión ambiente.
- Relación de altura/diámetro aproximada de 2,5:1
- El UniVessel® Glass tiene un volumen total de 13 L, y permite trabajar volúmenes de cultivo desde 1,5 L hasta 10 L.
- Componentes de equipamiento para cultivos celulares: Sensor de temperatura Pt 100, Electrodo de pH, electrodo polarográfico de pO₂.
- Tubo de gasificación con microaspersor (con poros de 10 µm)
- Dos agitadores segmentados de 3 paletas, con un diámetro de 78 mm

- Frascos de cultivo celular. La línea celular Sf-9 fue mantenida en suspensión en frascos de cultivo tipo “*spinner*” y en frascos de cultivo tipo “matraz” con diferentes volúmenes de trabajo (ver tabla 1).

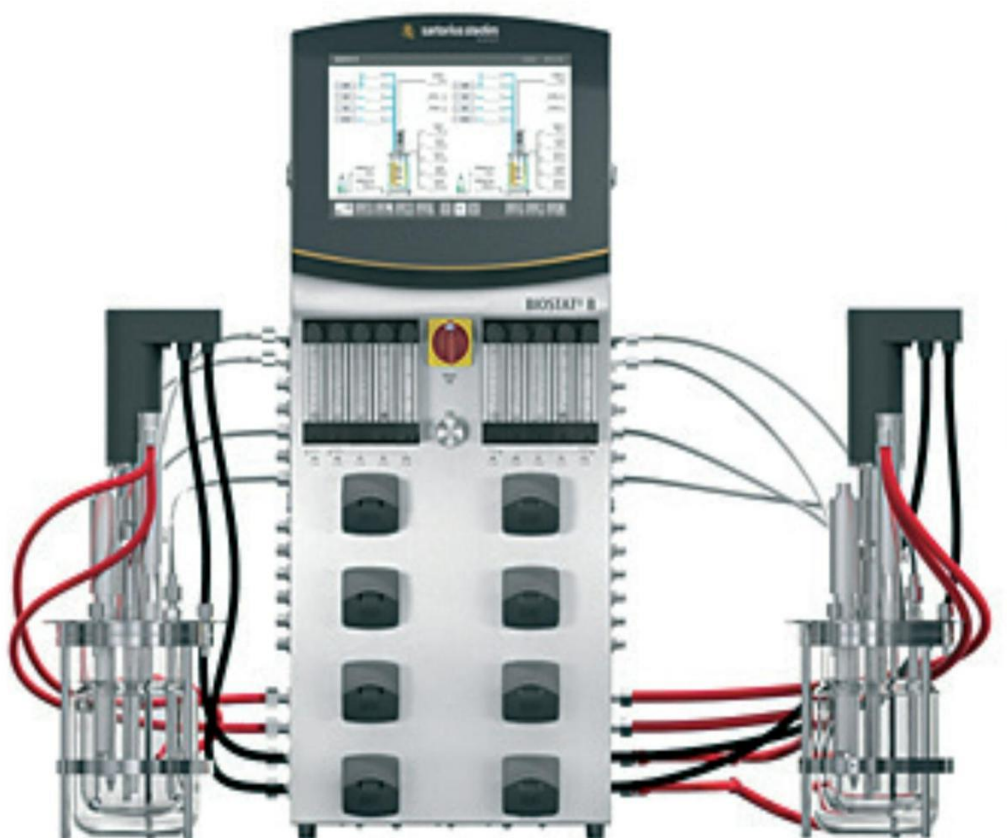


Figura 1. BIOSTAT® B-CC Twin con UniVessel® Glass

Tabla 1. Frascos de cultivo con diferentes volúmenes de trabajo

Recipiente de cultivo	Capacidad volumétrica (mL)	Volumen de trabajo (mL)	Utilidad
<i>Spinner</i>	100	40	Mantenimiento de las células Sf-9
	250	100	
	500	200	
	1000	450	
Matraz de vidrio <i>Erlenmeyer</i>	125	30	Ensayos de expresión de proteína
	250	60	
	500	120	
	1000	250	
Matraz de plástico <i>Corning</i>	250	100	Amplificación de baculovirus

4.2 Métodos

La secuencia y engranaje de los experimentos realizados para producir la glicoproteína G recombinante del VLTl se muestra en el flujograma de la Figura 2.

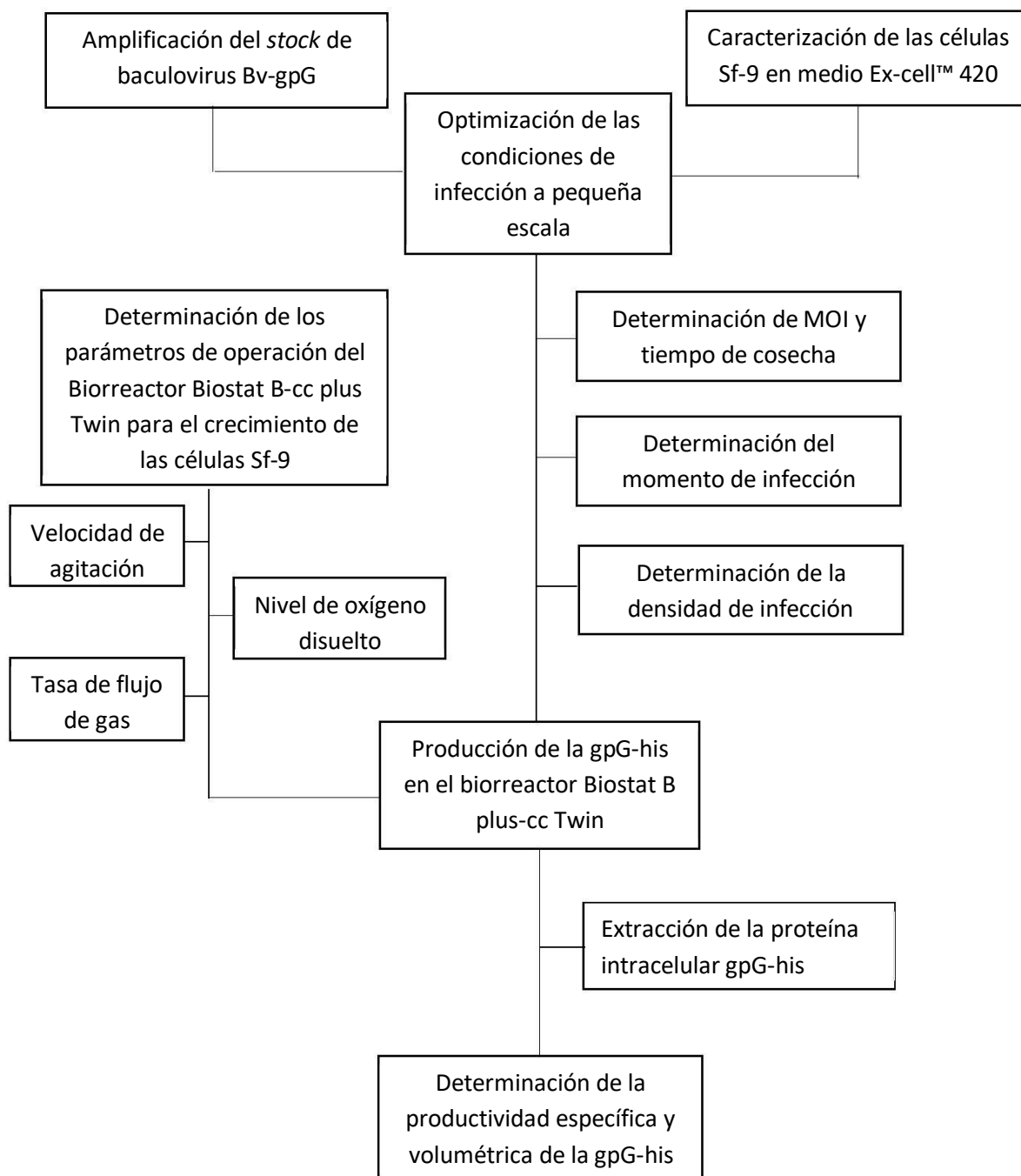


Figura 2. Flujograma de trabajo para la producción de la glicoproteína G recombinante del Virus de la Laringotraqueitis Infecciosa aviar utilizando el sistema de Baculovirus en células de Insecto en el Biorreactor Biostat B plus-cc Twin.

4.2.1 Caracterización del crecimiento de la línea celular de insecto Sf-9 mantenida en suspensión en medio libre de suero.

4.2.1.1 Preparación del medio de cultivo Ex-cell™ 420

Se utilizó agua ultrapura de calidad Milli-Q® autoclavada, se adicionó 30,78 g del medio libre de suero Ex-cell™ 420 (SAFC Biosciences, cat. no. 14420C) por cada litro de agua y se suplementó con 0,7 g de bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich, cat. no. S5761). Se dejó agitando por un mínimo de 3 horas y se filtró con una membrana de 0.22-µm (tamaño de poro). El pH se mantuvo en el rango de 6 a 6,3. Se dejó el medio a 27 grados centígrados durante dos días para controlar la esterilidad de este. Conviene diferenciar un medio fresco (medio utilizado para iniciar el cultivo) de un medio condicionado (medio en el que se han liberado diferentes compuestos biológicamente activos producto de células en crecimiento, en este caso, células Sf-9)

4.2.1.2 Cultivo, pasaje celular y criopreservación

El mantenimiento de las células Sf-9 se realizó en frascos de cultivo tipo *spinner*, a 27 grados centígrados y a una velocidad de agitación de 125 rpm. Las células fueron descongeladas a partir de un banco mantenido en nitrógeno líquido (Ver anexo 1. Descongelamiento de la línea celular Sf-9). Los pasajes se realizaron durante la fase exponencial, 3 veces por semana, registrando la densidad celular (cel/mL) y el porcentaje de viabilidad (%) en cada pasaje (Ver anexo 2. Subcultivo celular). Para asegurar la disponibilidad de la línea celular de forma permanente, se generaron bancos celulares, para ello, se criopreservaron células con poco número de pasajes (Ver anexo 3. Criopreservación de células Sf-9). Para ensayos de amplificación viral y expresión de proteína recombinante, se mantuvieron las células en matraces con diferentes volúmenes de trabajo a una velocidad de agitación de 120 rpm y a 27 grados centígrados.

4.2.1.3 Control de la Cinética de Crecimiento

Las células fueron sembradas a una densidad de $0,8 \times 10^6$ cel/mL en matraces *Erlenmeyer* de vidrio con 60 mL, 120 mL y 250 mL de volumen de trabajo y en *spinner* con 200 mL de volumen de trabajo. Se monitoreó el cultivo cada 24 horas, tomando alícuotas de 1 mL para determinar los valores de densidad y viabilidad celular empleando un hemocitómetro. Se determinó la máxima densidad celular alcanzada en cada recipiente de cultivo.

Para la determinación de las fases de crecimiento celular (latencia, exponencial, estacionaria y de muerte celular), se realizó una gráfica semilogarítmica (la densidad celular en escala logarítmica y el tiempo de crecimiento en escala lineal) empleando el *software* Microsoft Excel 2013. La identificación de las fases de crecimiento y de su duración se realizó siguiendo las indicaciones mostradas en la Figura 3.

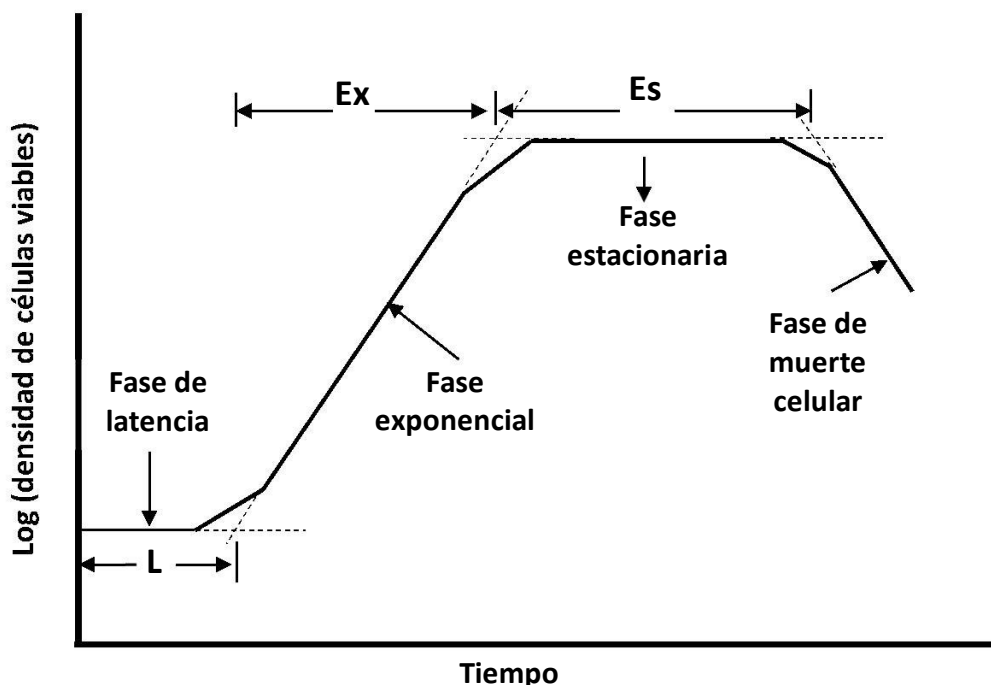


Figura 3. Curva de crecimiento celular típico. Se muestra la fase de latencia, exponencial, estacionaria y de muerte celular. La duración de la fase de latencia, la fase exponencial y la fase estacionaria es indicado por las letras L, Ex y Es, respectivamente.

Para el cálculo de la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{\max}), se obtuvo el logaritmo natural de la densidad celular durante la fase exponencial y se realizó una gráfica lineal en función del tiempo. Se determinó la ecuación de la recta. La pendiente de dicha ecuación se corresponde con μ_{\max} como se indica en la ecuación 1.

Ecuación 1.

$$\ln(N_t) = \ln(N_0) + \mu t$$

El tiempo de duplicación de la población celular (TDP) se calculó según la ecuación 2:

Ecuación 2.

$$TDP = \frac{\ln 2}{\mu}$$

4.2.2 Amplificación del baculovirus BV-gpG.

Para obtener una cantidad de partículas virales que puedan cubrir los ensayos a pequeña escala y en el biorreactor, se realizaron dos rondas de amplificación del *stock* de baculovirus BV-gpG de 2 pasajes (BV-gpG P2), el cual tenía un título desconocido y había sido mantenido a -80 grados centígrados durante 2 años. La Figura 4 resume el proceso de amplificación del baculovirus. La amplificación del baculovirus BV-gpG se realizó modificando el protocolo descrito previamente por King *et al.*, 2007.

Para la primera amplificación del baculovirus, se infectaron células Sf-9 en fase exponencial con 1 mL del virus en un matraz de vidrio con un volumen de trabajo de 60 mL. La densidad de infección fue de 1×10^6 cel/mL, se adicionó suero fetal

bovino al 2% y cloramfenicol 2,1 mg/mL. El cultivo se mantuvo a 27 grados centígrados y a una velocidad de agitación de 120 rpm. La cosecha de los virus brotantes se realizó a las 96 horas posteriores a la infección (hpi). La progenie de baculovirus generada -ahora de 3 pasajes- (BV-gpG P3) fue recuperada en el sobrenadante después de centrifugar el cultivo a 3 000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante fue almacenado en tubos Falcon oscuros a 4 grados centígrados. El baculovirus BV-gpG P3 fue cuantificado por el método de Ensayo en Placa (Ver anexo 4. Protocolo de cuantificación de baculovirus BV-gpG mediante Ensayo en Placa).

Para la segunda ronda de amplificación, se emplearon matraces de plástico de 250 mL (Corning, cat. no. CLS431144) con un volumen de trabajo de 100 mL. Se utilizó el baculovirus BV-gpG P3 para infectar células con una densidad de 2×10^6 cel/mL a un MOI de 0,1 (ver ecuación 3. para el cálculo del MOI), se adicionó suero fetal de bovino al 2 % y 2,1 mg/mL de cloramfenicol. Se mantuvo el cultivo en agitación a 120 rpm a 27 grados centígrados. La cosecha del baculovirus se realizó a las 96 hpi. Los baculovirus fueron recuperados en el sobrenadante, para ello, el cultivo fue centrifugado a 10 000 rpm, a 4 grados centígrados durante 1 hora, el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0,22 μ m y fue almacenado a 4 grados centígrados en oscuridad. El *stock* de baculovirus generado, de 4 pasajes (BV-gpG P4), fue cuantificado mediante Ensayo en Placa.

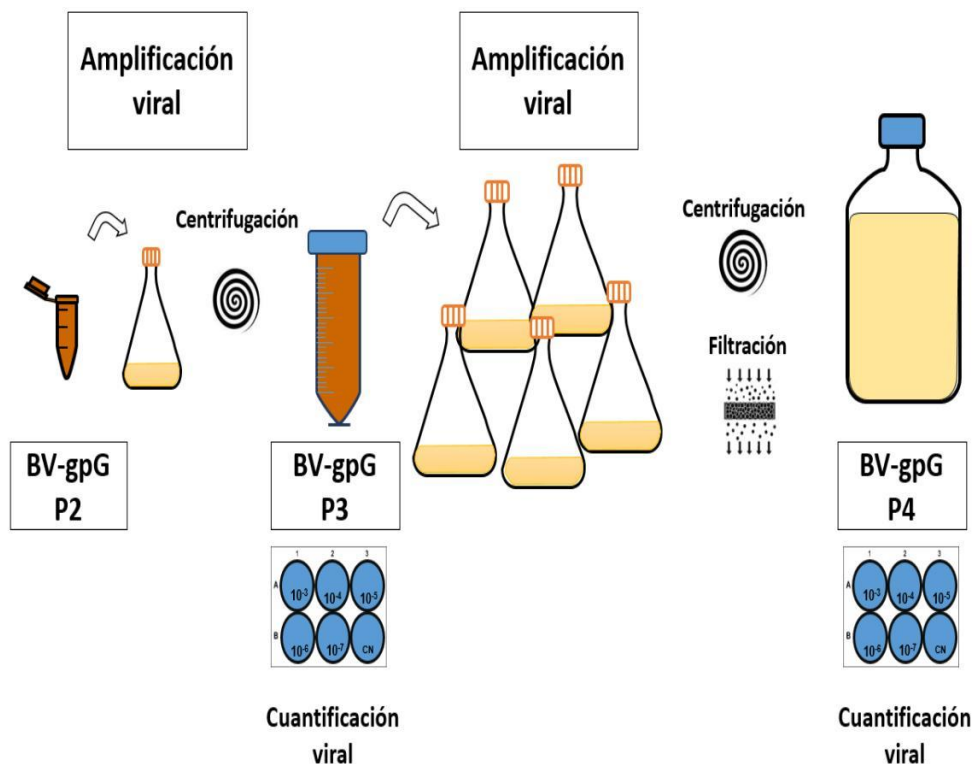


Figura 4. Esquema de amplificación del *stock* de baculovirus BV-gpG

El baculovirus amplificado BV-gpG P4 fue utilizado para todos los ensayos de expresión de gpG-his a pequeña escala y en el biorreactor.

4.2.3 Optimización de la producción de glicoproteína G a pequeña escala.

Para propósitos del presente trabajo, la expresión a “pequeña escala” será definida como los ensayos de expresión realizados tanto en cultivos en adherencia (desde placas de 96 pocillos) hasta cultivos en suspensión (*spinner* o matraz) con un volumen de trabajo menor o igual a 100 mL.

Una vez caracterizada las células de insecto Sf-9 sanas y obtenido el material viral para las infecciones, se pasó a evaluar la interacción del baculovirus BV-gpG P4 con las células Sf-9 para la producción de la glicoproteína G recombinante. Para este fin, se realizaron los siguientes ensayos:

4.2.3.1 Identificación de la multiplicidad de infección (MOI) y tiempo de cosecha óptimo.

Para determinar el MOI y tiempo de cosecha se realizó un experimento factorial en placas de 24 pocillos por duplicado, siguiendo el protocolo descrito por Harwood, 2007. En el ensayo se infectaron células con diferentes MOIs y se evaluó la producción de gpG-his en dependencia del tiempo posterior a la infección (48 hpi, 72 hpi y 96 hpi). La Figura 5 muestra la disposición de las variables evaluadas (MOI y tiempo de cosecha) en la placa de 24 pocillos.

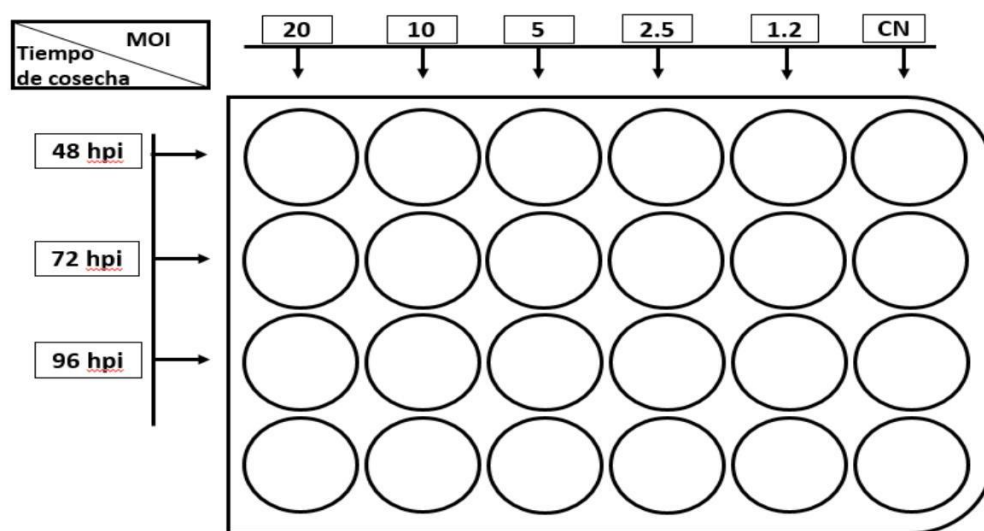


Figura 5. Distribución del MOI y tiempo de cosecha en placa de 24 pocillos.

Protocolo

- Se sembró 2×10^5 células Sf-9 por pocillo en una placa de 24 pocillos; para ello, se diluyó el cultivo celular en fase exponencial hasta 1×10^6 cel/mL y se colocó 200 μ L por pocillo en las tres primeras filas de la placa. En la cuarta fila se colocó 200 μ L de medio. Se dejó que las células se adhieran a la placa durante al menos 1 hora. Se incubó a temperatura ambiente.

- Mientras las células se adherían, se diluyó el *stock* de baculovirus para obtener MOIs de 20, 10, 5, 2,5 y 1,25 pfu/cel. Se añadió 50 µL del baculovirus a cada pocillo. La fórmula para calcular el MOI se observa en la ecuación 3.

Ecuación 3.

$$\text{MOI} = \frac{\text{Volumen de virus (mL)} * \text{Título viral}(\text{mL} \xrightarrow{\text{pfu}})}{\text{Cantidad de células}}$$

- Se colocó un MOI de 20 a la primera columna, un MOI de 10 a la segunda columna y así sucesivamente hasta colocar el MOI más bajo en la quinta columna, en la sexta columna se adicionó sólo medio para tener un control negativo de cada factor evaluado.
- Después de la adición del baculovirus, se movió suavemente la placa para dispersar el virus en la totalidad del pocillo de forma homogénea y se incubó a 27 grados centígrados en una cámara húmeda (bolsa plástica con un papel humedecido en su interior) para que la monocapa de células no se seque en el proceso.
- Se cosecharon las células, resuspendiendo la monocapa de cada pocillo con el mismo medio de cultivo. La primera fila se cosechó a las 48 horas, la segunda fila a las 72 horas y la tercera fila a las 96 horas. Las células se colocaron en tubos de 1,5 mL. Manteniendo las células en suspensión, se retiró 90 µL a otro tubo y se mezcló con 30 µL del *buffer* de carga 4X SDS. Se calentó a 90 grados centígrados durante 5 minutos y se almacenó a -80 grados centígrados para futuros análisis.
- Después de haber colectado todos los puntos, se evaluó la producción de gpG-his mediante *Western Blot*

Este ensayo, permitió identificar el MOI y tiempo de cosecha óptimo para los siguientes ensayos de expresión de la glicoproteína G.

4.2.3.2 Producción de gpG-his en dependencia de la fase de crecimiento celular al momento de infección.

El presente ensayo tuvo como finalidad, determinar si la fase de crecimiento celular en la que se encontraban las células al momento de infección influía en la producción de gpH-his. Para ello, cada 24 horas se retiraron células a partir de un matraz sumidero con células en continuo crecimiento, para ser infectadas en otros matraces.

En el matraz sumidero, con 250 mL de volumen de trabajo, se sembraron células Sf-9 con una densidad de $0,8 \times 10^6$ cel/mL. Transcurrida 24 horas se tomó una alícuota, la cual fue transferida a un matraz pequeño con 30 mL de volumen de trabajo y fue infectada con el baculovirus BV-gpG. Se realizó el mismo procedimiento a las 48, 72, 96 y 120 horas de crecimiento de las células en el matraz sumidero. Las 5 alícuotas retiradas del matraz sumidero se infectaron con una densidad de 1×10^6 cel/mL, un MOI de 2, suplementado con cloramfenicol 2,1 mg/mL.

La producción de gpG-his en cada matraz infectado fue evaluada a las 48 y 72 hpi, para ello se sacaron 90 µL de cada matraz y se mezclaron con 30 µL de *buffer* 4X SDS en tubos de 1,5 mL; se calentaron los tubos a 90 grados centígrados por 5 minutos y se guardaron a -80 grados centígrados. La detección de la proteína se realizó mediante *Western blot*. En la Figura 6 se muestra el diseño del experimento para la determinación del momento de infección.

Una vez finalizado el ensayo descrito, se determinó el momento de infección óptimo para la producción de gpG-his y esa información fue utilizada en el siguiente ensayo de expresión.

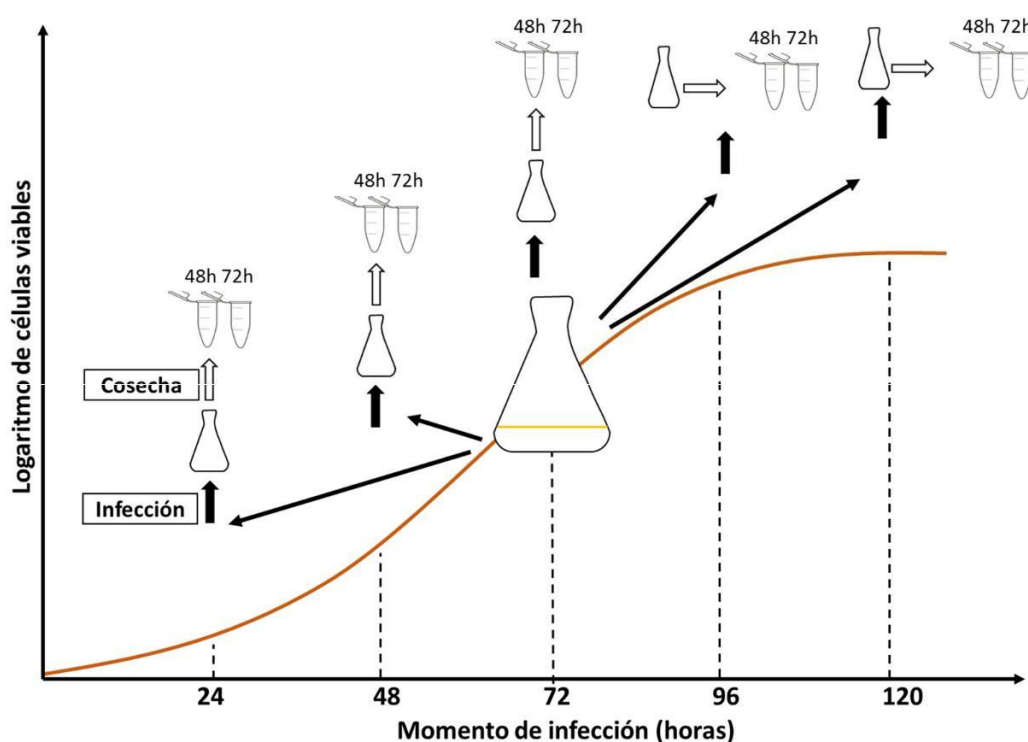


Figura 6. Diseño del experimento para la determinación del momento de infección óptimo para la producción de gpG-his.

4.2.3.2 Producción de proteína en dependencia de la densidad celular al momento de infección.

Identificado el MOI, tiempo de cosecha y el momento de infección, se realizaron dos ensayos para determinar la densidad celular óptima al momento de infección.

En el primer ensayo, se sembraron células con una densidad de $0,8 \times 10^6$ cel/mL en un matraz con 250 mL de volumen de trabajo; a las 48 horas de crecimiento, se tomaron alícuotas y sin cambio de medio, éstas fueron infectadas a diferentes densidades (1×10^6 cel/mL, 2×10^6 cel/mL y 3×10^6 cel/mL) en matraces con 30 mL de volumen de trabajo. El esquema del ensayo es mostrado en la Figura 7.

En el segundo ensayo, las células antes de ser infectadas fueron centrifugadas a 600 rpm y resuspendidas en medio fresco. Las densidades de infección fueron de

4×10^7 cel/mL, 5×10^7 cel/mL, 6×10^7 cel/mL y 8×10^7 cel/mL. Las células se infectaron con el baculovirus BV-gpG P4 utilizando un MOI de 2 en el medio de cultivo suplementado con cloramfenicol a 2,1 mg/mL. Las células se cosecharon a las 72 hpi y la producción de gpG-his fue analizada mediante *Western blot*.

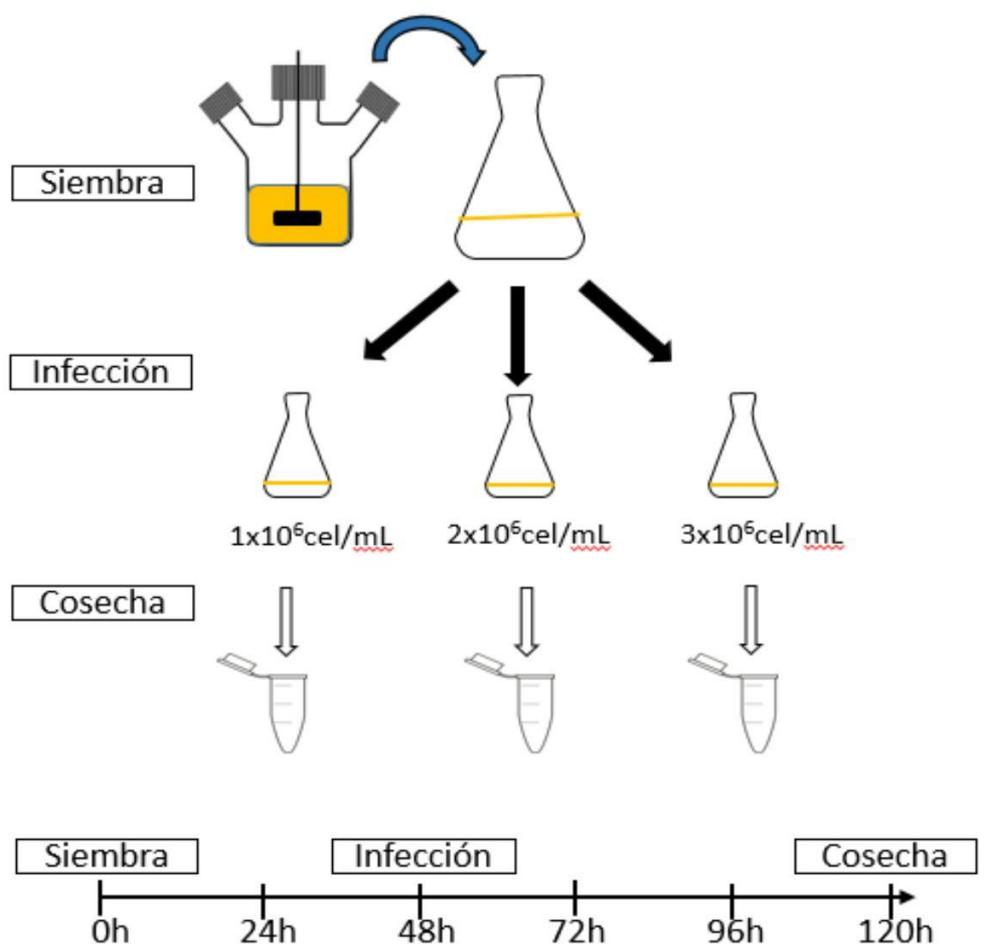


Figura 7. Esquema de trabajo para la determinación de la densidad celular óptima al momento de infección para la producción de gpG-his.

Hasta este punto del trabajo, se identificaron el MOI, el tiempo de cosecha, el momento de infección y la densidad celular al momento de infección. Dichos parámetros fueron utilizados para la producción de gpG-his en el biorreactor Biostat B® plus Twin.

4.2.4 Establecimiento de los parámetros de operación del biorreactor

Biostat B plus para el crecimiento de células Sf-9

Las células de insecto Sf-9 crecieron en el biorreactor agitado BIOSTAT B® plus Twin de 10 L (Sartorius Stedim Systems GmbH, Guxhagen, Alemania) con un volumen de trabajo de 3,5 litros. Antes de sembrar las células en el biorreactor, los sensores de oxígeno y de pH fueron calibrados según las indicaciones de manufactura del equipo. Las principales características del biorreactor Biostat B plus fueron descritas en el apartado 4.1.3 (Equipos y materiales de laboratorio).

El biorreactor BIOSTAT B® plus permitió configurar parámetros importantes para el crecimiento celular como el porcentaje de oxígeno disuelto, la tasa de aireación, velocidad de agitación, temperatura y pH.

- **Porcentaje de Oxígeno disuelto (pO_2)**

Se comparó el crecimiento celular de las células Sf-9 variando el pO_2 en el cultivo. Se evaluaron porcentajes de 20%, 40% y 70%. El porcentaje de oxígeno disuelto fue controlado por la inyección de aire y/o oxígeno directamente al medio vía *sparger*.

Para evaluar esta variables, se mantuvieron constantes otros parámetros de operación como: temperatura a 27 grados, tasa de flujo de aire a 0,04 vvm, tasa de flujo de oxígeno a 0,003 vvm, velocidad de agitación a 140 rpm y el pH entre 6 a 6.3

- **Tasa de aireación (vvm).**

La influencia de dos diferentes tasas de aireación (0,04 vvm y 0,08 vvm) en el crecimiento de las células Sf-9 fue evaluado. En ambos casos, los gases fueron suministrados directamente al medio empleando un microaspersor, el pO_2 fue mantenido a 40%, la temperatura a 27 grados centígrados y la velocidad de agitación de 140 rpm.

- **Velocidad de agitación (rpm)**

La velocidad de agitación es un factor importante porque al generar turbulencia, permite la homogenización de los nutrientes y aumentar la tasa de transferencia de oxígeno; en el presente ensayo se evaluó el crecimiento de las células Sf-9 a 140 y 170 rpm. El pO₂ fue mantenido constante a 40% y la tasa de aireación a 0.04 vvm.

- **Temperatura**

La temperatura se mantuvo constante a 27 grados centígrados gracias a la conexión de un *chiller* al equipo, que permitió la recirculación del agua de la chaqueta del biorreactor.

- **pH**

El pH se mantuvo en un rango de 6 a 6.3. El valor del pH fue registrado *online* por el sensor del equipo y su lectura fue corroborada empleando un pH metro.

Cálculos de Parámetros Hidrodinámicos

Muchos parámetros hidrodinámicos fueron obtenidos: el número de Froude, el número de Reynolds, la velocidad de disipación de energía turbulenta por unidad de masa, el tamaño de Kolmogorov y el estrés de corte.

- **Número de Froude ()**; representa la tasa entre la fuerza inercial y gravitacional. Su valor se obtiene a partir de la siguiente ecuación.

Ecuación 4.

$$= \frac{N^2 D_i^3}{g}$$

Donde:

N: tasa de agitación

D_i: diámetro del agitador

g: constante gravitacional

- **Número de Reynolds del agitador** (); variable adimensional que caracteriza el flujo de un fluido, mide la turbulencia y es importante para la transferencia de gases y mezcla de nutrientes en un recipiente agitado.

Ecuación 5.

$$= \frac{\rho N D_i^2}{\mu}$$

Donde:

N : tasa de agitación
 ρ : densidad del medio
 μ : viscosidad del medio
 D_i : diámetro del agitador

- **Diámetro de remolino de Kolmogorov** (); permite determinar el daño celular asociado a la turbulencia generada producto de la agitación. Si el diámetro del remolino generado es mayor al diámetro de las células cultivadas, no habría daño asociado.

Ecuación 6.

$$= \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{1/4}$$

Donde:

ν : viscosidad cinemática
 ε : velocidad de disipación de energía turbulenta por unidad de masa

- **Velocidad de disipación de energía turbulenta por unidad de masa** ();

Ecuación 7.

$$= \frac{P}{V}$$

Donde:

P : número potencia
 N : tasa de agitación
 D_i : diámetro del agitador

El número potencia del agitador utilizado en el presente trabajo es de 1.2 (Kaiser Kaiser, 2013). La ecuación 7 está basada en la idea de que el volumen dentro del cual la energía es disipada es

- **Estrés de corte** (τ);

Ecuación 8.

$$\tau = \frac{\epsilon}{\mu}$$

Donde

- ν : viscosidad cinemática
- μ : viscosidad del medio
- ϵ : velocidad de disipación de energía turbulenta por unidad de masa

4.2.5 Producción de la glicoproteína G recombinante en el biorreactor

BIOSTAT B® plus Twin.

Una vez controlado los parámetros de operación del biorreactor que aseguraron un ambiente adecuado para el crecimiento de las células de insecto Sf-9, dos ensayos de producción de gpG-his en el biorreactor con un volumen de trabajo de 3,5 L fueron realizados bajo un sistema discontinuo. Para los ensayos de producción, dos *stocks* de BV-gpG P4 con diferente título fueron utilizados (3,5 x 10⁷ pfu/mL y 3 x 10⁷ pfu/mL para el primer y segundo ensayo, respectivamente).

- Condiciones de sembrado

Se sembraron células provenientes de la fase exponencial de crecimiento a una densidad de 0,8 x 10⁶ células/mL en un volumen de trabajo de 3 litros.

- Condiciones de infección

Al segundo día de crecimiento, el cultivo fue llevado a una densidad de 2 x 10⁶ cel/mL en un volumen de 3,5 L y fue infectado con 400 mL y 470 mL de baculovirus

BV-gpG de 4 pasajes (primer y segundo ensayo, respectivamente), se empleó un MOI de 2 y se adicionó cloramfenicol 2,1 mg/mL al medio. La densidad y viabilidad celular fue monitoreada cada 24 horas. A su vez, se tomaron alícuotas a las 48, 72 y 96 hpi para evaluar la producción de proteína recombinante mediante *Western blot* y por ELISA *sandwich* (Ver anexo 6. Protocolo de cuantificación de glicoproteína G mediante ELISA *sandwich*). El tiempo de cosecha se realizó a las 72 horas y/o 96 horas posteriores a la infección, en dependencia de la viabilidad celular.

4.2.6 Evaluación de la productividad volumétrica de la glicoproteína G recombinante

4.2.6.1 Extracción de proteínas

El aislamiento de la gpG-his desde las células Sf-9 fue realizado tomando como base el protocolo descrito por (Kavran y Leahy, 2014).

Una vez determinado el tiempo de cosecha, las células fueron recolectadas en frascos cónicos de 500 mL y centrifugadas a 3 500 rpm a 4 grados centígrados durante 10 minutos. El *pellet* celular fue resuspendido en la proporción de 50 µL de *buffer* de lisis A por cada 10⁶ células (Sigma Aldrich cat. No E1014) y se incubó a 4 grados centígrados durante 30 minutos en constante homogenización. Luego, las células resuspendidas fueron sometidas a una presión de 80 psi, 3 veces seguidas, empleando un dispositivo de prensa francesa (Avestin EmulsiFlex-C3). El lisado celular fue clarificado por centrifugación a 11 000 rpm durante 60 minutos a 4 grados centígrados y el sobrenadante fue filtrado por una membrana de 0,22-µm (tamaño de poro) y almacenado a -80 grados centígrados para posteriores análisis.

* *Buffer* de lisis A: 25mM Tris-HCL pH 8,0, 300 mM NaCL y 10% glicerol, preparado en agua ultrapura.

4.2.6.2 Cuantificación de la glicoproteína G por ELISA sandwich.

Un anticuerpo policlonal de conejo anti glicoproteína G fue empleado como anticuerpo de captura, éste fue preparado a una concentración de 3 µg/mL en buffer carbonatado (pH 9,4). Se cargó 100 µL del anticuerpo de captura en una placa de ELISA estándar de 96 pocillos y se dejó incubando *overnight* a 4 grados centígrados. La placa fue lavada 3 veces con 100 µL de buffer de lavado (pH 7,4). Sitios inespecíficos de unión fueron bloqueados con buffer de bloqueo (pH 7,4) durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Se colocaron 100 µL de los estándares, controles y muestras e inmediatamente se adicionó 50 µL de anticuerpo de detección (anticuerpo monoclonal de ratón anti-his unido a HRP) preparado a una concentración de 0,25 µg/mL en buffer de bloqueo. La placa se dejó incubando en agitación a 650 rpm a temperatura ambiente durante 90 minutos. Se lavó la placa 5 veces con buffer de lavado. Se agregó 100 µL de TMB y se incubó durante 30 minutos en agitación a 650 rpm a temperatura ambiente y protegido de la luz. La reacción fue detenida añadiendo 100 µL de H₂SO₄ 2N. La lectura de la absorbancia se realizó a 450 nm empleando el espectrofotómetro de microplacas Epoch (Biotek). Para la cuantificación, una dilución seriada del estándar (gpG purificada) en el rango de 30-900 ng/mL fue utilizada. La productividad volumétrica fue expresada en mg/L de cultivo y la productividad específica en mg/10⁶ células.

V. RESULTADOS

5.1 Cinética de crecimiento de la línea celular de insecto Sf-9 a pequeña escala

La cinética de crecimiento de las células Sf-9 mostró comportamientos similares en los cultivos de matraces con 125 mL, 250 mL y en el *spinner* con 200 mL (Figura 8). En todos los sistemas de cultivo se observó que la fase de latencia se encuentra ausente y que la fase exponencial tuvo una duración de 96 horas; sin embargo, la fase estacionaria tuvo una duración más corta en el *spinner* (48 horas) comparada con ambos matraces (96 horas). La máxima densidad celular alcanzada fue de $8,7 \times 10^6$ cel/mL, $8,2 \times 10^6$ cel/mL y $7,6 \times 10^6$ cel/mL en el matraz con 125 mL, 250 mL y en el *spinner* con 200 mL, respectivamente.

Así mismo, en la fase exponencial de crecimiento (Figura 9), se observó que la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{\max}) fue de 0,26/h en el matraz con 125 mL y de 0,025/h en el matraz con 250 mL y *spinner* con 200 mL. La tasa de duplicación celular (TDP) fue de 27 horas para el matraz con 125 mL y de 28 horas para el matraz con 250 mL y el *spinner* con 200 mL.

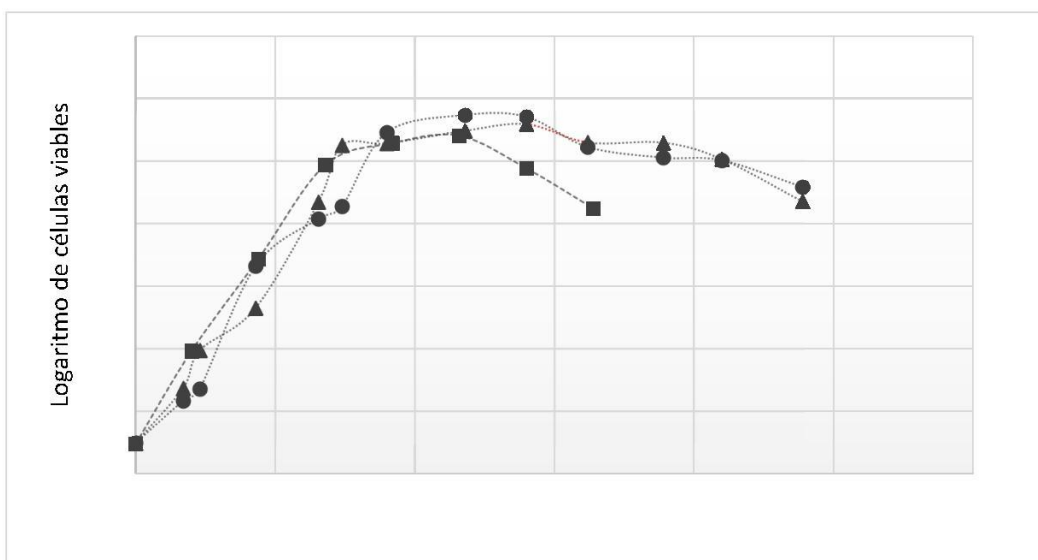


Figura 8. Cinética de crecimiento de las células Sf-9 en matraz con 125 mL (●), matraz con 250 mL (▲) y en *spinner* con 200mL (■).

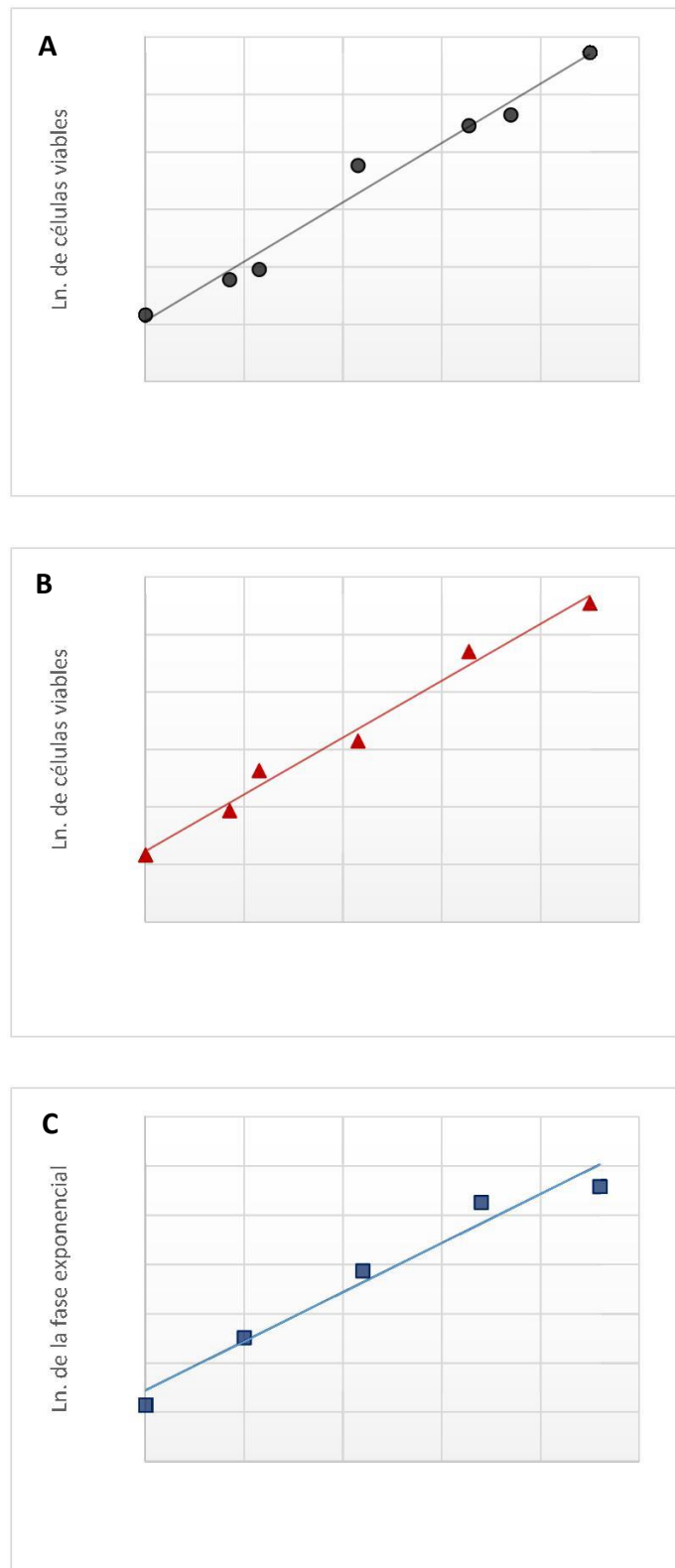


Figura 9. Linealización de la fase exponencial de crecimiento de las células Sf-9. A. Crecimiento en matraz con 125 mL. B. Crecimiento en matraz con 250 mL. C. Crecimiento en *spinner* con 200 mL.

En la tabla 2 se resumen características importantes del crecimiento de las células Sf-9 tanto en los matraces como en el *spinner*.

Tabla 2. Características de la cinética de crecimiento de las células Sf-9

Vol. de trabajo	F. de latencia	Duración de F. exponencial (horas)	Densidad celular máxima ($\times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$)	μ_{max} (h^{-1})	PDT (horas)
M 125 mL	ausente	96	8,7	0,026	27,0
M 250 mL	ausente	96	8,2	0,025	28,0
S 200 mL	ausente	96	7,6	0,025	28,0

M=matraz
S=*spinner*
F= fase

5.2 Optimización de la producción de la proteína recombinante a pequeña escala.

5.2.1 Determinación de la multiplicidad de infección (MOI) y tiempo de cosecha para la expresión de glicoproteína G-his *tagged*.

Para optimizar la producción la gpG-his en células Sf-9, considerando el MOI y el tiempo de cosecha, las células fueron infectadas a MOIs de 1,2, 2, 5, 10 y 20. La producción de proteína fue evaluada por *western blot* a las 48, 72 y 96 hpi utilizando un anticuerpo específico para la cola his de la proteína. Las bandas de la proteína de interés mostradas en el *western blot*, fueron analizadas por densitometría empleando el *software* Image J.

Las células infectadas con el baculovirus BV-gpG expresaron la gpG-his a las 48, 72 y 96 hpi de manera independiente al MOI empleado. Sin embargo, una mayor cantidad de gpG-his fue expresada cuando las células Sf-9 fueron cosechadas a las 72 hpi en comparación de las células cosechadas a las 48 hpi (Figura 10 y Figura 11)
















Tiempo de cosecha (h)	MOI				
	20	10	5	2.5	1.2
48					
72					
96					

Figura 10. Células Sf-9 infectadas con el baculovirus BV-gpG a diferente Multiplicidad de infección (MOI) y tiempo de cosecha (en horas). El *Western Blot* fue realizado empleando un anticuerpo de ratón monoclonal anti-His conjugado con HRP (*GenScript*)

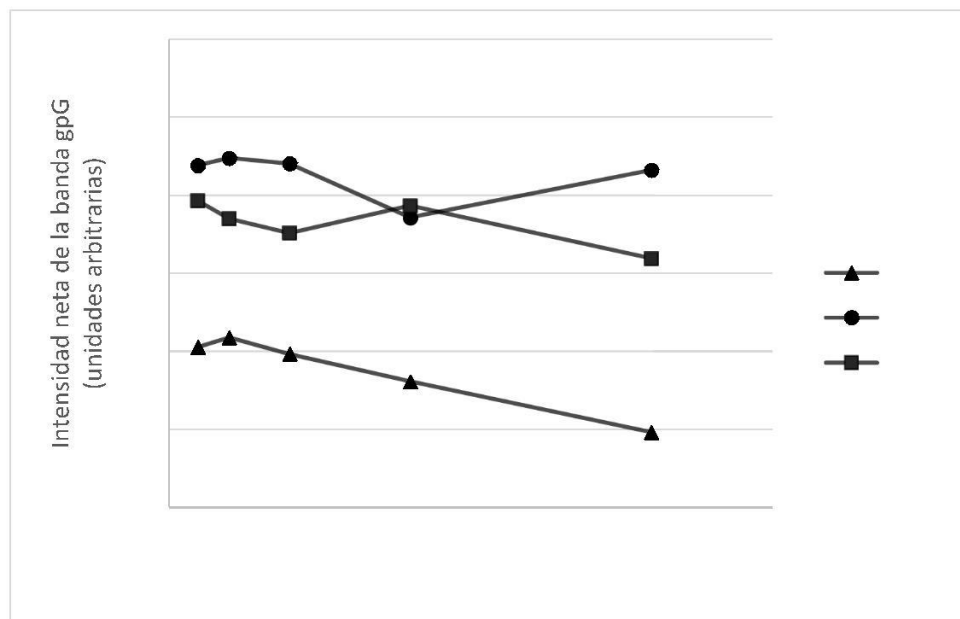


Figura 11. Efecto del MOI y tiempo de cosecha en la expresión de gpG-his

Al final de este ensayo se decidió trabajar con una MOI de 2 y un tiempo de cosecha de 72 hpi para las siguientes fases de optimización de la expresión de gpG-his.

5.2.2 Determinación del momento óptimo de infección

Para determinar el momento óptimo de infección para la expresión de la glicoproteína G-his *tagged*, las células fueron infectadas en diferentes etapas de

crecimiento (24, 48, 72 y 96 horas posteriores a la siembra) con el baculovirus Bv-gpG P4 en matraces con un volumen de trabajo de 30 mL. La densidad celular de infección fue de 1×10^6 cel/mL y la producción de gpG-his en el cultivo fue evaluada a las 48 y 72 hpi mediante *western blot* y densitometría. El comportamiento de las células Sf-9 frente a la infección fue caracterizado teniendo en cuenta la viabilidad y la densidad de células viables a las 48 y 72 hpi.

El nivel de expresión de gpG-his fue mayor al infectar células Sf-9 en etapas tempranas de crecimiento (24 y 48 horas). Se produjo una caída de la producción de gpG-his al infectar las células a las 72 y 96 horas de crecimiento. Las variaciones observadas del nivel de expresión de gpG-his en dependencia del MOI se mantuvieron tanto a las 48 hpi como a las 72 hpi (Figura 12 y Figura 13)

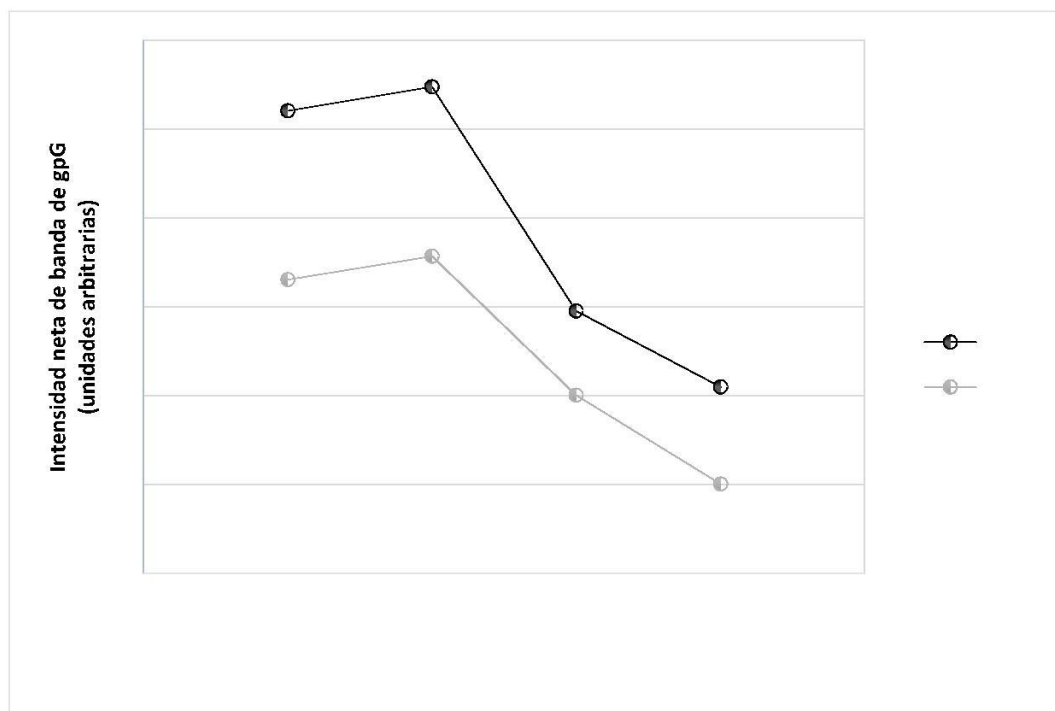


Figura 12. Nivel de expresión de gpG-his en relación al tiempo de crecimiento de las células sf-9. Se identificó el tiempo óptimo de infección

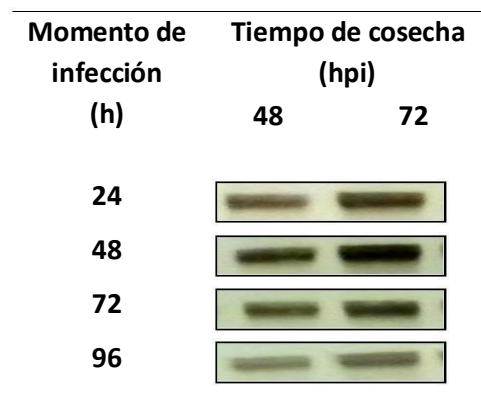


Figura 13. Producción de gpG-his en dependencia del momento de infección (horas posteriores a la siembra de células Sf-9). La expresión de gpG-his fue detectada mediante *Western Blot* empleando un anticuerpo monoclonal anti-his.

5.2.3 Efecto de la densidad celular al momento de infección en la producción de la gpG-his

Para incrementar el rendimiento volumétrico, la densidad celular fue incrementada al momento de infección. La producción de gpG-his fue comparada al realizar 2 protocolos diferentes de infección. En el primer protocolo, se infectaron células a una densidad de 1×10^6 cel/mL, 2×10^6 cel/mL y 3×10^6 cel/mL con el baculovirus Bv-gpG P4 con título de 3×10^7 pfu/mL sin reemplazar el medio al momento de infección (medio condicionado). En el segundo caso, se infectaron células con un baculovirus Bv-gpG P4 con título de 1×10^8 pfu/mL (mantenido en medio fresco) a una densidad de 3×10^6 cel/mL, 4×10^6 cel/mL, 6×10^6 cel/mL y 7×10^6 cel/mL en medio fresco (las células fueron centrifugadas y resuspendidas en medio fresco al momento de infección)

En este ensayo se observó que cuando se infectaron las células en medio fresco y con un *stock* viral concentrado también en medio fresco, la densidad celular pudo ser incrementada hasta 7×10^6 cel/mL sin afectar la productividad de glicoproteína G-his *tagged* (Figura 15). Sin embargo, al realizar la infección en medio condicionado y con un *stock* viral contenido también en medio condicionado, la densidad celular solo pudo ser incrementada hasta 3×10^6 cel/mL (Figura 14).

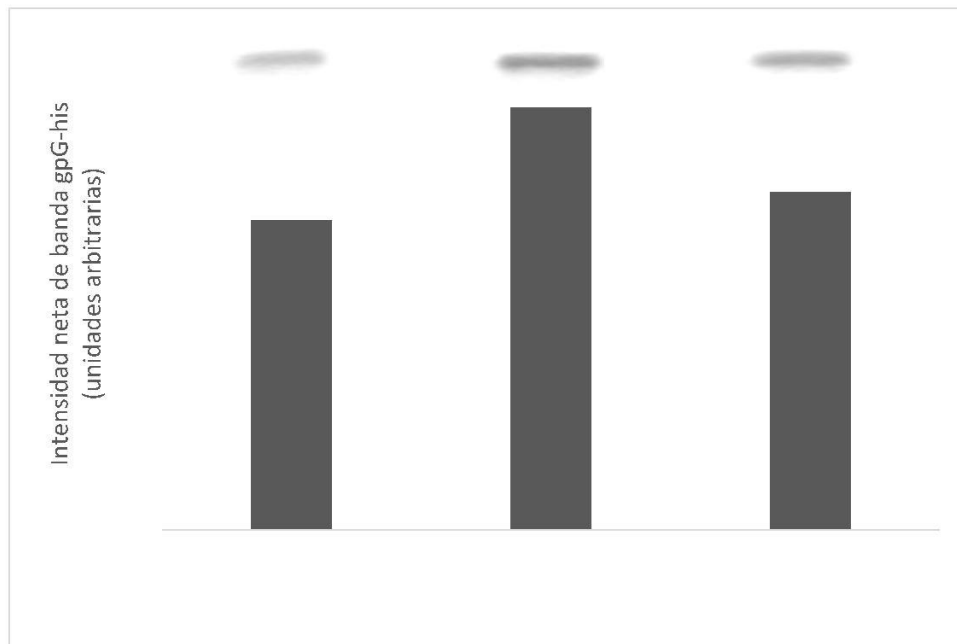


Figura 14 Efecto de la densidad celular al momento de infección en la producción de gpG-his en medio condicionado. La producción de gpG fue determinada mediante *western blot* (bandas superiores)

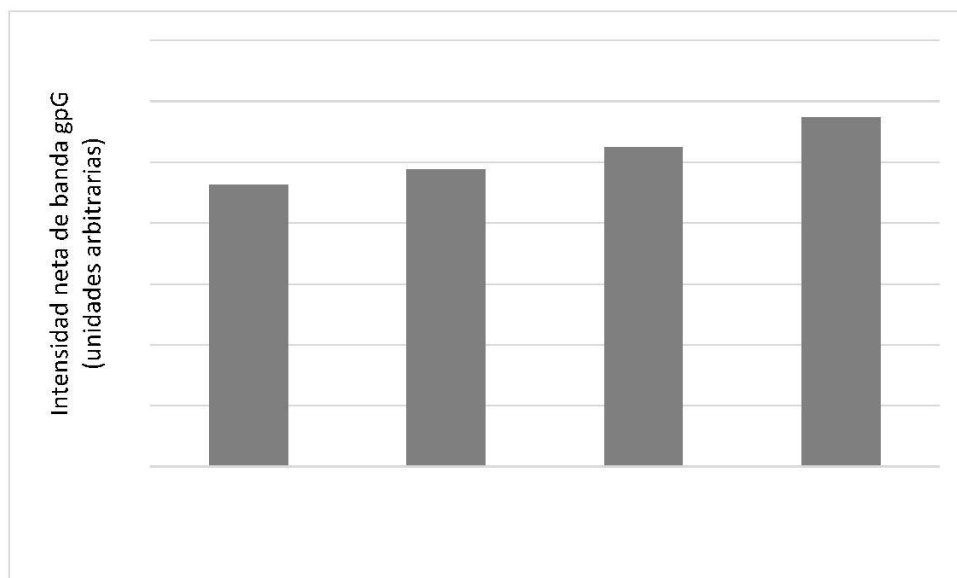


Figura 15. Efecto de la densidad celular al momento de infección en la producción de gpG-his en medio fresco (renovación de medio al momento de infección)

5.3 Establecimiento de condiciones hidrodinámicas óptimas para el crecimiento de células Sf-9 en el Biorreactor Biostat B plus –CC twin

La producción de proteína utilizando BEVS y células de insecto involucra dos fases: el crecimiento celular y la infección con el baculovirus recombinante. Los ensayos se realizaron para determinar valores óptimos de la tasa de agitación (en rpm) , el porcentaje de oxígeno disuelto (% pO₂) y la tasa de aireación (en vvm) para el crecimiento de las células Sf-9 en medio Ex–cell 420™.

La tabla 3 muestra los resultados del experimento realizado para determinar la tasa de agitación óptima. En este experimento la tasa de aireación fue mantenida constante a 0,04 vvm y el pO₂ a 40%, el cual fue controlado por un sistema en cascada de inyección de aire y oxígeno puro. Como se observa en la tabla 3, no se produjo daño celular al emplearse tasas de agitación de 140 y 170 rpm (viabilidad celular alta, 100%) ni se registraron variaciones en la tasa específica de crecimiento.

Tabla 3. Influencia de la tasa de agitación en el crecimiento de células Sf-9

Tasa de agitación (RPM)	T0		T24		μ_e (h ⁻¹)
	Densidad (x10 ⁶ cel/mL)	Viabilidad (%)	Densidad (x10 ⁶ cel/mL)	Viabilidad (%)	
140	1	99	1,9	100	0,027
170	1	99	1,9	100	0,027

La influencia del porcentaje de oxígeno disuelto en el crecimiento de las células Sf-9 es mostrada en la tabla 4. En dicho experimento la tasa de aireación fue mantenida en 0,04 vvm y la tasa de agitación a 140 rpm. Como se observa, los diferentes niveles de oxígeno disuelto no ocasionan daño celular (viabilidad alta, 100%); sin embargo, la velocidad específica de crecimiento se ve afectada por dicha variable, siendo menor (0,020/h) al trabajar con bajos niveles de oxígeno (10%).

Tabla 4. Influencia del porcentaje de oxígeno disuelto en el crecimiento de células Sf-9 en medio Ex-cell 420™.

Oxígeno disuelto (% pO₂)	T0		T24		μ_e (h⁻¹)
	Densidad (x10⁶cel/mL)	Viabilidad (%)	Densidad (x10⁶cel/mL)	Viabilidad (%)	
10	1	99	1,6	100	0,020
40	1	99	1,9	100	0,027
70	1	99	1,8	100	0,024

La tabla 5 muestra los resultados de la influencia de la aireación en el crecimiento de las células Sf-9. En dicho experimento, el pO₂ se mantuvo a 40% y la tasa de agitación a 140 rpm. Se observó un crecimiento celular acelerado (μ_e de 0,035/h) al emplear una tasa de aireación de 0,08 vvm comparado al crecimiento con una tasa de 0,04 vvm (μ_e de 0,025/h); sin embargo, la tasa de aireación de 0,08 vvm constituyó un factor de estrés, ocasionando daño celular en el cultivo (viabilidad celular baja, 89%), a diferencia de lo ocurrido al emplear una tasa de aireación de 0,04 vvm, donde la viabilidad se mantuvo alta (97%).

Tabla 5. Influencia de la tasa de aireación en el crecimiento de células Sf-9

Tasa de aireación (vvm)	T0		T24		μ_e (h⁻¹)
	Densidad (x10⁶cel/mL)	Viabilidad (%)	Densidad (x10⁶cel/mL)	Viabilidad (%)	
0,004	0,6	98	1,1	97	0,025
0,012	0,6	98	1,4	89	0,035

Una vez estudiado el efecto de la tasa de agitación, la tasa de aireación y el % de pO₂, se evaluó el crecimiento de las células durante 72 horas bajo las siguientes condiciones:

pO₂ al 40%, tasa de aireación a 0,04 vvm y tasa de agitación de 140 rpm. La Figura 16 muestra la fase exponencial de las células Sf-9; donde la pendiente de la recta, indica la velocidad específica de crecimiento (0,026/h)

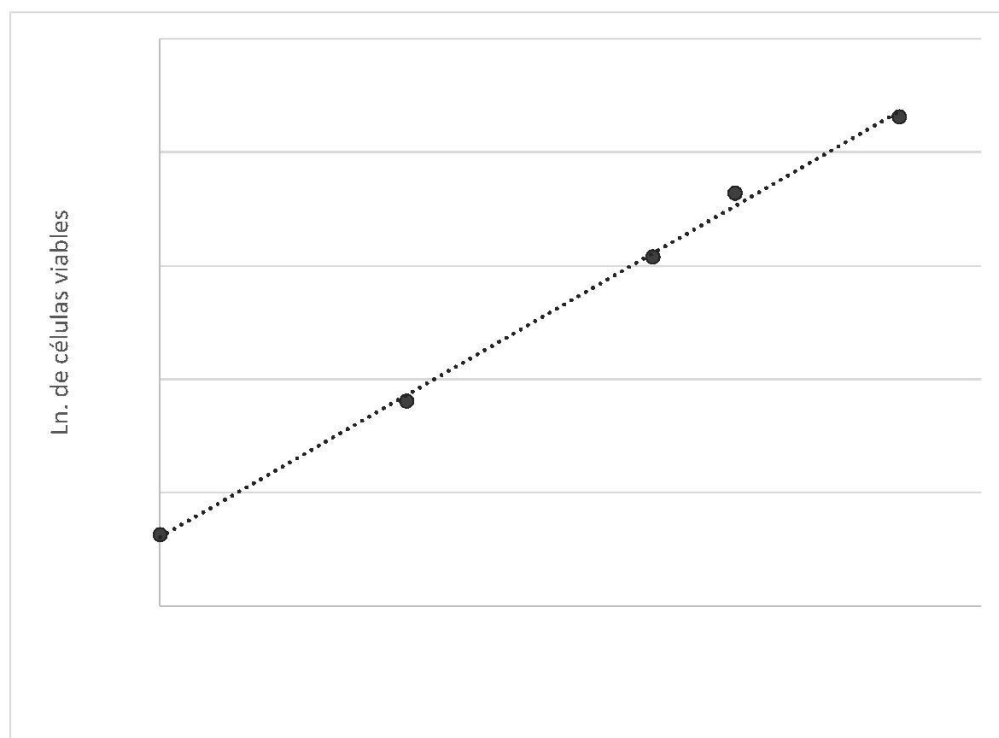


Figura 16. Linealización de la fase exponencial de crecimiento de las células Sf-9 en el Biorreactor Biostat B plus.

Para obtener una base de discusión de los resultados, parámetros hidrodinámicos como el número de Froude, el número de Reynolds, el diámetro del remolino de Kolmogorov, la velocidad de disipación de energía turbulenta por unidad de masa, y el estrés de corte fueron calculados (tabla 6). Para comparar los valores de estos parámetros con los valores obtenidos en otros reportes, la densidad y viscosidad utilizada fueron las del agua a 27 grados centígrados.

Los valores del número de Froude generados por una velocidad de agitación de 140 y 170 rpm fueron de 0,043 y 0,064, respectivamente; mientras que los valores del número

de Reynolds fueron de 16 540 y 20 090 trabajando a 140 y 170 rpm, respectivamente. Así mismo, como se observa en la tabla 6, el diámetro del remolino de Kolmogorov generado a 170 rpm tuvo un valor de 69 μm y el estrés de corte, un valor de 0,38 N/m^2 .

Tabla 6. Parámetros hidrodinámicos generados en el Biorreactor Biostat B plus durante el cultivo de células Sf-9

Tasa de agitación (RPM)	Número de Froude (Fr)	Número de Reynolds (Re)	Tasa de disipación de la energía por unidad de masa (m^2s^{-3})	Tamaño de remolino de Kolmogoroff (μm)	Estrés por ruptura (N.m^{-2})
140	0,043	16 540	0,093	93	0,28
170	0,064	20 090	0,166	69	0,38

Una vez evaluado los diferentes parámetros de operación del biorreactor, se estableció la siguiente configuración para el crecimiento e infección de células Sf-9 en el biorreactor: pO_2 a **40%**, velocidad de agitación de **140 rpm**, tasa de flujo de aire de **0,04 vvm**, tasa de flujo de oxígeno (desde **0,001 vvm** a **0,003 vvm**), pH regulado entre **6 a 6,3** y una temperatura de **27** grados. El nivel de pO_2 se mantuvo por un control en cascada del ingreso de aire y/o oxígeno por vía *sparger*.

5.4 Producción de glicoproteína G en el biorreactor Biostat B plus.

Se realizaron dos ensayos, donde las células Sf-9 fueron infectadas a una densidad de $2 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ con el baculovirus Bv-gpG P4, empleando un MOI de 2 y cosechadas a las 72 hpi. El volumen de trabajo en el biorreactor fue de 3,5 L. Las tablas 7 y 8 muestran el comportamiento de las células infectadas en el sistema de biorreactor comparado a la infección en matraces.

Tabla 7. Comportamiento de las células Sf-9 infectadas con el baculovirus Bv-gpG P4 de título $3,5 \times 10^7$ pfu/mL

Tiempo	Biorreactor ensayo 1		Matraz	
	Densidad (10^6 cel/mL)	Viabilidad (%)	Densidad (10^6 cel/mL)	Viabilidad (%)
T0	2	99	2	99
T24	2,4	95	2,8	94
T48	2,6	82	1,6	57
T72	2	78	--	--

Tabla 8. Comportamiento de las células Sf-9 infectadas con el baculovirus Bv-gpG P4 de título 3×10^7 pfu/mL

Tiempo	Biorreactor ensayo 2		Matraz	
	Densidad (10^6 cel/mL)	Viabilidad (%)	Densidad (10^6 cel/mL)	Viabilidad (%)
T0	2	99	2	99
T24	2	92	2,4	83
T48	1,8	82	2	74
T72	1,8	78	1,5	52

La producción de gpG-his fue evaluada mediante *Western Blot* (Figura 17) y ELISA *Sandwich* (Figura 18). La tabla 9, muestra los valores de productividad volumétrica y específica obtenida en los dos ensayos realizados en el biorreactor Biostat B plus, observando una productividad volumétrica máxima de **3,66 mg/L**.

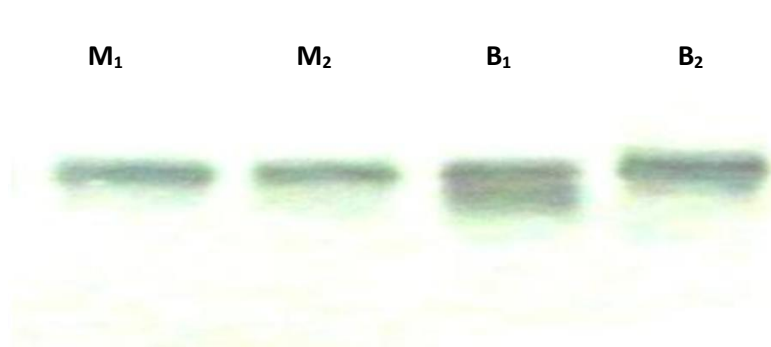


Figura 17. Determinación de la producción de glicoproteína G en dos sistemas de cultivo: en el biorreactor Biostat B plus (B) y en el matraz (M). Los subíndices (1 y 2) indican un primer y segundo ensayo respectivamente. La detección de proteína se realizó mediante *western blot* empleando un anticuerpo monoclonal anti-his

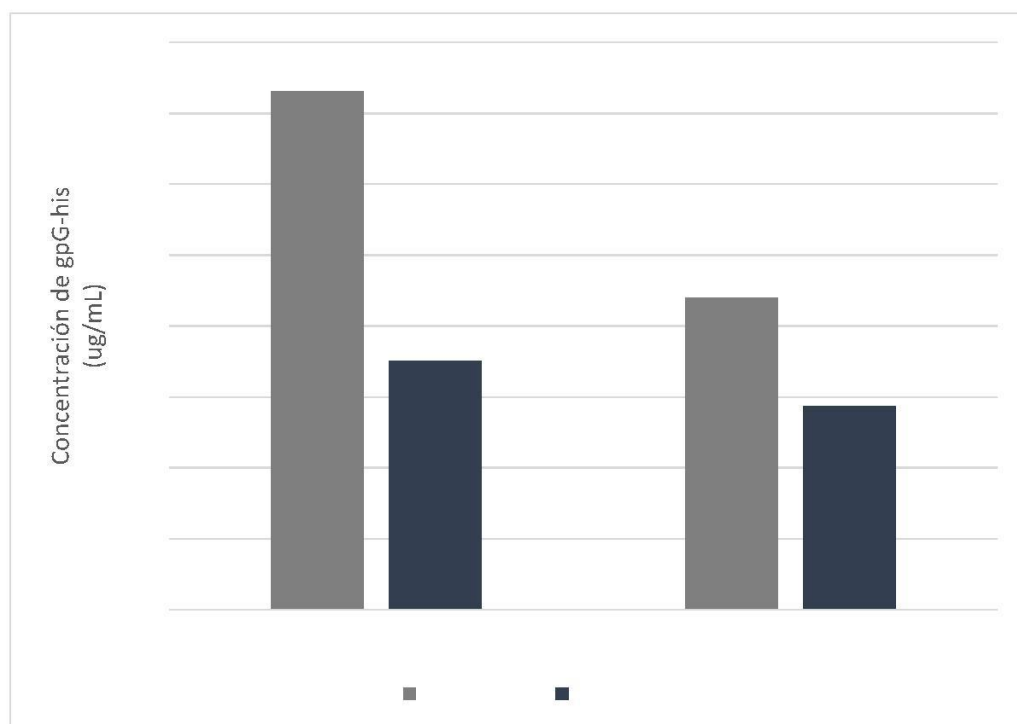


Figura 18. Producción de gpG-his en células Sf-9 infectadas con el baculovirus BV-gpG en el biorreactor Biostat B plus. La cuantificación de la proteína (µg/mL) fue determinada mediante un ELISA sandwich.

Tabla 9. Glicoproteína His-*tagged* determinada en cosecha de células Sf-9 infectadas con el baculovirus Bv-gpG en el biorreactor Biostat B plus empleando un ELISA cuantitativo tipo sandwich.

	Ensayo 1		Ensayo 2	
	Biorreactor	Matraz	Biorreactor	Matraz
Productividad volumétrica (ug/mL)	3,66	1,76	2,20	1,44
Productividad específica (pg/cel)	1,8	0,88	1,1	0,72

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La glicoproteína G codificada por el VLTl es una proteína de interés dado que ha mostrado ser importante para la patogénesis del virus (Devlin *et al.*, 2006), logrando alterar la respuesta inmune del hospedero desde una respuesta humoral hacia una celular (Devlin *et al.*, 2010). Asimismo, la gpG ha sido reconocida como un grupo particular de proteínas virales de unión a quimioquinas (Devlin *et al.*, 2010), y ha sido sugerido, utilizarla para tratar enfermedades autoinmunes (Lucas y McFadden, 2004). Además, un estudio ha mostrado el potencial uso de la gpG-his recombinante producida por *E.coli* como una herramienta de diagnóstico (ELISA) para la detección de anticuerpos en el suero de aves infectadas con el VLTl (Shil *et al.*, 2012).

Dada la importancia de la gpG-his en el campo biotecnológico se hace necesario contar con una plataforma de producción que permita realizar futuros ensayos funcionales y estructurales de la proteína.

En el presente trabajo, la glicoproteína G recombinante del VLTl fue expresada en un tanque agitado con 3.5 L volúmenes de trabajo utilizando el sistema de células de insecto infectadas con un baculovirus recombinante. Para poder expresar la gpG-his en el tanque agitado, primero se tuvo que caracterizar el crecimiento de la línea celular Sf-9 en diferentes volúmenes de trabajo y recipientes de cultivo; optimizar las condiciones de infección a pequeña escala como son la multiplicidad de infección, el tiempo de cosecha, el momento de infección y la densidad de infección y determinar las condiciones hidrodinámicas óptimas para el crecimiento de las células Sf-9 sanas en el biorreactor.

6.1 Cinética de crecimiento de la línea celular Sf-9 a pequeña escala

La curva de crecimiento típica de una línea celular muestra 4 fases de crecimiento: fase de latencia, estacionaria, exponencial y de muerte celular; siendo los principales parámetros para caracterizar el crecimiento celular la tasa específica de crecimiento (μ), el tiempo de doblaje poblacional (TDP), la fase de latencia y la densidad celular

máxima. Dichos parámetros dependen de la línea celular específica y del ambiente de crecimiento (nivel de oxígeno disuelto, concentración de nutrientes, temperatura, pH, entre otros). También es importante evaluar la viabilidad celular como un indicador de la calidad celular (Rhiel *et al.*, 1997).

En este estudio, se observó que tanto el cultivo en matraces como en *spinner* mostró comportamientos de crecimiento similares (fase de latencia ausente, fase exponencial de 96 horas, fase estacionaria y fase de muerte celular). En trabajos previos, se observó que la fase de latencia sólo está presente cuando se subcultivan células desde la fase estacionaria (con limitación de nutrientes) o con una densidad muy baja ($0,2 \times 10^6$ cel/mL); esto debido a que las células se tienen que adaptar a las nuevas condiciones del cultivo (rico en nutrientes); mientras que al subcultivar células desde la fase exponencial, donde no hay una limitación de nutrientes, no es necesaria una fase de adaptación (Schmid, 1996; Doverskog *et al.*, 2000).

A su vez, aquí se registraron tasas específicas de crecimiento de 0,025/h y 0,026/h y TDPs de 26 y 27 horas. La literatura reporta variación de la tasa de crecimiento en el rango de 0,029/h a 0,035/h y TDPs de 20 a 24 horas para las líneas Sf-9, Sf-21 y Tn-5 (Rhiel *et al.*, 1997). Si las condiciones ambientales se mantienen sin cambios, se atribuye que la variación en el éxito del cultivo depende de la calidad y tiempo del inóculo (Kioukia *et al.*, 1996). Así mismo, se explica que la variabilidad de los parámetros de crecimiento aumenta al trabajar con matraces y/o *spinner* ya que existe un ambiente hidrodinámico mal definido sin control del nivel de oxígeno (Kioukia *et al.*, 1995). En el presente trabajo se subcultivaron células con un similar número de pasajes (entre 8 a 12 pasajes después de ser descongeladas) que explicaría la poca variación observada entre los valores cinéticos de crecimiento. Sin embargo, se observó también, que la línea celular Sf-9 adaptada a las condiciones de cultivo de nuestro laboratorio, mostró una TDP menor (22 a 24 horas) y menor viabilidad celular (entre 90 a 95%) cuando eran subcultivadas con un número

de pasajes mayor a 30 (data no mostrada). Finalmente, la densidad máxima alcanzada en este trabajo, estuvo en el mismo orden de magnitud (10^6 cel/mL), con pequeñas diferencias entre los sistemas. En otros trabajos se muestra la variabilidad de éste parámetro, en dependencia de la calidad del inóculo y también del medio de cultivo, llegando hasta valores de 10^7 cel/mL en algunos casos (Schmid, 1996). Por lo tanto, es importante caracterizar el crecimiento de la cepa del laboratorio, de acuerdo al número de pasajes, el medio de cultivo, y las condiciones ambientales presentes.

6.2 Efecto de la multiplicidad de infección (MOI) y tiempo de cosecha en la producción de gpG-his

Varios estudios han mostrado que el título de la proteína heteróloga β -galactosidasa obtenida al infectar células en fase exponencial temprana, fue independiente del MOI empleado (de 0 a 100 y de 0,1 a 10), pero se produjo una fuerte caída de la producción cuando se infectaron células en fase estacionaria (Mairoella *et al.*, 1988; Licari *et al.*, 1991). Asimismo, Radford *et al.*, encontraron que bajo condiciones controladas, sin limitación de nutrientes, el efecto del MOI (0.1 a 10 pfu/cel) en la productividad específica de la proteína no secretada β -galactosidasa fue insignificante (Radford *et al.*, 1997). En este estudio, pudo observarse que la producción de glicoproteína G-his tagged fue independiente para valores de MOIs comprendidos entre 1,2 a 20 cuando se infectaron células en fase exponencial. La distribución de Poisson predice que a MOIs mayores de 5 se genera una infección sincrónica (con el 99% de células infectadas), y a una MOI de 1,2, se produce la infección del 70% de la población celular. El aparente efecto negativo de utilizar un MOI bajo, es superado por una segunda ronda de infección, donde los baculovirus generados por las células infectadas al inicio, infectaran a la población celular restante y que, además, luego de 24 horas habrían duplicado su cantidad. Debido a los estudios que muestran que la producción de proteína recombinante no se ve

afectada por la MOI, existen reportes que recomiendan el uso de una baja multiplicidad de infección para la producción de proteínas recombinantes (Wong *et al.*, 1996), debido a que permite utilizar una pequeña cantidad de *stock* viral para la infección; evitando, de esta manera, la adición de volúmenes mayores de medio condicionado al cultivo, y a su vez, evita la necesidad de realizar constantes amplificaciones del stock viral y por ende, que se produzca un efecto de pasaje. Por lo expuesto, para los demás ensayos de optimización y producción a gran escala, un MOI de 2 fue elegido.

Debido a la naturaleza lítica del sistema de baculovirus y células de insecto, determinar el tiempo de cosecha óptimo es crítico para maximizar el rendimiento de la proteína. Métodos propuestos para monitorear la infección del cultivo de las células de insecto, han incluido, entre otros, la medición de la tasa de captura de oxígeno (Palomares y Ramirez, 1996), la viabilidad (Jain *et al.*, 1991) y el cambio en el diámetro celular modal (Jain *et al.*, 1991; Palomares *et al.*, 2001). En este trabajo, se realizó un experimento factorial, en placa de 24 pocillos, y observamos que la máxima producción de gpG-his se generó a las 72 hpi, este resultado fue corroborado posteriormente en ensayos realizados en el sistema de matraces. La presencia de gpG-his a las 96 hpi, sin evidencia marcada de degradación, sugiere la estabilidad de la glicoproteína en el medio Ex - cell 420, por lo menos, durante 96 hpi.

6.3 Efecto de la fase de crecimiento al momento de infección en la producción de la glicoproteína G-his tagged

Estudios iniciales, sugieren que la variación en la susceptibilidad a la infección y rendimiento de producto se debe a la fase del ciclo celular en las que se encuentran distribuidas las células al momento de infección (Brown y Faulkner, 1975). En tal sentido, trabajos previos han mostrado que una mayor población celular se encuentra distribuida en la fase “S” del ciclo celular durante la etapa de crecimiento exponencial y en la fase G₂/M durante la fase de latencia y fase estacionaria. (Kioukia *et al.*, 1995;

Doverskog *et al.*, 2000). Kioukia *et al.*, mostraron que la producción de β -galactosidasa fue significativamente mayor en células obtenidas desde la fase exponencial que en células obtenidas desde la fase estacionaria (Kioukia *et al.*, 1995). En este estudio, se obtuvo una mayor producción de glicoproteína G-his tagged al infectar las células obtenidas desde la fase exponencial media (48 horas de crecimiento) y se observó una caída de la producción en el tránsito de la fase exponencial a estacionaria (96 horas de crecimiento). Dado que las células fueron subcultivadas e infectadas a 1×10^6 cel/mL, sin limitación de nutrientes, este resultado sugiere que las células con mayor tasa de proliferación (fase exponencial) y distribuidas en la fase “S” del ciclo celular, son más susceptibles a la infección y producción de glicoproteína G-his tagged.

6.4 Producción de gpG-his en dependencia de la densidad celular al momento de infección

Trabajos previos determinaron que la productividad específica de proteína recombinante (β -galactosidasa) decae rápidamente al infectar células a una densidad mayor a 3×10^6 cel/mL en un cultivo *batch* (Bédard *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 1996; Ljunggren *et al.*, 1999). La caída abrupta del rendimiento de la proteína ha sido, parcialmente, revertida al emplear una estrategia de “alimentación con nutrientes y/o renovación del medio al momento de infección (Hensler *et al.*, 1994; Bédard *et al.*, 1997). Sin embargo, otros estudios señalan que la densidad celular al momento de infección no influye en la productividad de la proteína recombinante (Kioukia *et al.*, 1995). En este estudio, trabajando en un cultivo *batch* sin recambio de medio, se encontró que la productividad específica y volumétrica de gpG-his disminuyó al realizar la infección a una densidad de 3×10^6 cel/mL comparada a la productividad obtenida a los 2×10^6 cel/mL; mientras que cuando las células fueron resuspendidas en medio fresco previo a la infección, se observó que el rendimiento volumétrico de gpG-his fue aumentando conforme aumentaba la densidad de infección hasta 7×10^6

cel/mL. Dicho resultado confirma la sugerencia temprana de que es la limitación de nutrientes, en lugar de la inhibición por acumulación de producto, quien controla la densidad celular máxima en cultivos Sf-9 (Bédard *et al.*, 1993).

6.5 Efecto de las condiciones hidrodinámicas en el crecimiento de células Sf-9 en el Biorreactor Biostat B plus

Uno de los principales problemas para el crecimiento de células de insecto en un tanque agitado es la sensibilidad de ruptura de estas células. Una tasa de agitación inapropiada puede causar estrés en el cultivo de células Sf-9, ocasionando una caída de la viabilidad celular y/o alteraciones de la tasa de crecimiento (Kioukia *et al.*, 1996); así mismo, la aireación directa del medio de cultivo también constituye un factor de estrés en estas células por la formación y coalescencia de burbujas (Trinh *et al.*, 1994).

Como se muestra en este trabajo, una tasa de agitación de 170 rpm genera un estrés de corte de 0.388 N.m^{-2} que no afecta la viabilidad ni la tasa de crecimiento de las células Sf-9. Los resultados concuerdan con estudios previos, donde se determinó que valores inferiores a 1 N.m^{-2} de estrés de corte no afectaban el crecimiento de las células Sf-9 (Cruz *et al.*, 1998; Maranga *et al.*, 2004).

En la literatura, el valor óptimo de pO_2 reportado para el crecimiento de células de insecto varía desde 5 a 100%, dependiendo del tipo y tamaño del biorreactor, el modo de operación, el medio de cultivo y la línea celular (Schmid, 1996). Existen algunos estudios que indican que el crecimiento celular es independiente del valor de pO_2 si este valor es superior al 10% (Hensler y Agathos, 1994; Palomares y Ramirez, 1996; Maranga *et al.*, 2002); mientras que otros estudios reportan un valor óptimo de ~ 40% y que valores inferiores al 20% y mayores al 70% afectan la tasa específica de crecimiento (Klöppinger *et al.*, 1990; Jain *et al.*, 1991). Los valores presentados aquí registran una tasa específica de crecimiento de 0.027/h trabajando con un nivel de oxígeno disuelto de 40%. Al trabajar con niveles de oxígeno disuelto de 20% y 80%,

la tasa de crecimiento disminuyó en un 26% y 13% respectivamente. En experimentos anteriores donde el nivel de pO_2 en el cultivo, cayó por debajo del 10%, la inhibición completa del crecimiento celular fue observada (data no mostrada). Acorde a los resultados encontrados en la literatura, la disminución de la tasa de crecimiento puede deberse a la inanición de oxígeno y acumulación de CO_2 que ocurre al trabajar con bajos niveles de oxígeno o por el estrés oxidativo causado por la formación de radicales libres al trabajar con valores altos de pO_2 (Agathos, 1996; Jain *et al.*, 1991).

El suministro de aire y/o oxígeno para mantener un nivel de pO_2 de 40%, se realizó mediante un microaspersor debido a que fue imposible mantener dicho nivel de pO_2 solo con la inyección de aire a la cabeza del biorreactor. Las tasas de aireación evaluadas fueron de 0,04 vvm y de 0,08 vvm; se observó que una tasa de aireación de 0,04 vvm no afectó la viabilidad ni la tasa de crecimiento de las células Sf-9; sin embargo, una tasa de aireación de 0,08 vvm a pesar de haber generado una tasa específica de crecimiento mayor (0,35 vvm) afectó marcadamente la viabilidad celular, reduciéndola al 89 %. En trabajos previos se ha reportado una dependencia directa del daño celular con la tasa de agitación por encima de 0,04 vvm (Cruz *et al.*, 1998). Trabajos previos han permitido relacionar la tasa de daño o muerte celular con la frecuencia de rompimiento de burbujas en la superficie y con el volumen asociado a dichas burbujas en un biorreactor de columna de burbujeo (Chisti, 2000)

6.6 Producción de glicoproteína G en el biorreactor Biostat B plus.

Trabajos previos han reportado rendimientos de proteínas recombinantes producidas en células de insecto que varían ampliamente, desde 1 a 600 mg/L (Mairoella *et al.*, 1988). Si bien gran parte de la variabilidad en la expresión de proteínas se debe a las propiedades genéticas de cada recombinante, también es cierto que las condiciones de cultivo celular y los parámetros de infección viral influyen directamente en el rendimiento. A nivel de biorreactor, un estudio previo, empleando

un cultivo *batch* y sin renovación de medio al momento de infección, obtuvo un rendimiento volumétrico de 2 a 4 mg/L de la glicoproteína hemaglutinina del Virus de la Influenza (Holtz *et al.*, 2003). Otro estudio, empleando un sistema *batch* pero con renovación de medio al momento de infección logró un rendimiento de 16 mg/L del antígeno nuclear 1 del Virus de Epstein-Bar (Meij *et al.*, 2000), mientras que otros estudios empleando cultivos bajo el sistema *Fed-batch* han reportado rendimientos de hasta 200 mg/L del receptor de membrana HSVrgD2 del Virus del Herpes Simple (Elias *et al.*, 2007).

En el presente trabajo se realizaron dos ensayos para la producción de gpG-his empleando dos stocks de baculovirus diferentes. Un rendimiento volumétrico máximo de 3.66 mg/L y un rendimiento específico de 1,8 pg/cel fueron obtenidos en un primer ensayo del biorreactor, representando un aumento de 2 *fold* con respecto a la producción obtenida en el matraz. En un segundo ensayo, se produjo 2,20 mg/L de proteína representando un aumento de 1,5 *fold* con respecto a la producción en el matraz (1,44 mg/L). Se sugiere que la variación del rendimiento de proteína inter ensayos se debe a la naturaleza misma del inóculo (los ensayos se realizaron con diferente inóculo) y al empleo de *stock* virales con diferente título. Los volúmenes de virus añadidos al cultivo para el primer y segundo ensayo, representan la adición de un 11% y 13% de medio condicionado con respecto al volumen total de trabajo, respectivamente.

La cinética de infección en el biorreactor fue diferente de la registrada en el matraz, observándose una mayor densidad de células viables y una caída más lenta de la viabilidad en el biorreactor posterior a la infección. La viabilidad celular a las 72 hpi en el biorreactor se mantuvo en 78%, mientras que en el matraz estuvo al 50%. Debido a que las células Sf-9 incrementan la tasa de consumo de oxígeno tras la infección, y que en el biorreactor la presión de oxígeno disuelto se mantiene constante y por encima del 40%, se plantea que existe un ambiente más favorable

para el crecimiento de las células y que la caída de la viabilidad se debe estrictamente a la infección y no a limitaciones de oxígeno o carencia de nutrientes, representando una ventaja importante para la producción de glicoproteína G-his *tagged*.

Las condiciones de infección optimizadas a pequeña escala y utilizadas en la producción de gpG-his a nivel de biorreactor incluye el uso de células Sf-9 en fase exponencial, con una densidad de 2×10^6 cel/mL, un MOI de 2 y cosechadas a las 72 hpi. El biorreactor se configuró para mantener una tasa de agitación de 140 rpm, una presión de oxígeno disuelto de 40% inyectando aire y oxígeno simultáneamente en el medio de cultivo, a una tasa de 0,03 vvm y 0,002, respectivamente. Las condiciones descritas permitieron alcanzar un rendimiento de gpG-his de 3,66 mg/L en un cultivo *batch* empleando un baculovirus con 4 pasajes y título de 3.5×10^7 pfu/cel.

El método para la producción de glicoproteína G del VLTl reportado aquí, puede ser empleado como una plataforma de manufactura reproducible de gpG-his de gran utilidad para la producción de grandes cantidades de proteína, lo cual permitirá realizar estudios para caracterizar estructural y funcionalmente a la glicoproteína G recombinante del VLTl.

VII. CONCLUSIONES

- Se logró caracterizar el crecimiento de las células Sf-9 a pequeña escala mantenidas a 27 grados centígrados y a 125 rpm en medio Ex – cell 420™: tasa específica de crecimiento $0,027\text{ h}^{-1}$, TDP de 27 horas, con fase de latencia ausente y una densidad celular máxima de $8 \times 10^7\text{ cel/mL}$.
- Se logró optimizar la producción de gpG-his a pequeña escala empleando células en fase exponencial, infectadas a una densidad de $2 \times 10^6\text{ cel/mL}$ con un MOI de 2 y cosechadas a las 72 hpi.
- La configuración del biorreactor Biostat B-plus a una velocidad de agitación de 140 rpm, una presión de oxígeno de 40% y una tasa de aireación de 0,04 vvm aseguraron el crecimiento de células Sf-9 a una tasa específica de crecimiento de $0,026/\text{h}$ y TDP de 26,6 horas, con una viabilidad superior al 98%.
- El porcentaje de oxígeno disuelto (pO_2) presente en el medio influye en la tasa específica de crecimiento de las células Sf-9, ésta se reduce al trabajar con valores inferiores al 15% y superiores al 80%, quedando inhibido el crecimiento al emplear valores inferiores al 5%, sin embargo, la viabilidad no se vio afectada
- Una tasa de agitación de 170 rpm, no afecta la cinética de crecimiento ni la viabilidad de las células Sf-9 al trabajar con un valor de pO_2 de 40% y a una tasa de aireación de 0,04 vvm
- Un valor de 0,08 vvm afecta marcadamente el crecimiento de células Sf-9, principalmente la viabilidad, la cual se redujo al 80% después de 24 horas de exposición.
- Se logró obtener un rendimiento volumétrico de 3,66 mg/L de gpG-his en el Biorreactor Biostat B plus con 3,5 litros de cultivo de células Sf-9 infectadas a una densidad de $2 \times 10^6\text{ cel/mL}$, un MOI de 2 y cosechadas a las 72 hpi.

VIII. RECOMENDACIONES

- Utilizar un mismo inóculo celular y *stock* viral en todos los ensayos de optimización y producción que garantice mayor reproducibilidad en el rendimiento de proteínas recombinantes.
- La contaminación es un problema común en el cultivo de células, por tanto, es de gran importancia utilizar técnicas asépticas para el mantenimiento del cultivo.
- Realizar un seguimiento exhaustivo del cultivo es importante, para identificar el número de pasajes por encima del cual las células comienzan a alterar su morfología y a disminuir su viabilidad y productividad.
- Disponer de un banco celular joven, permitirá mantener un mismo inóculo durante mayor tiempo.
- Implementar una estrategia de alimentación (modo *Fed-batch*) para el crecimiento de las células Sf-9 permitirá infectar células a una mayor densidad celular, aumentando así la producción de gpG-his
- El empleo de un método efectivo de concentración de virus, como la filtración tangencial, permitirá utilizar un pequeño volumen de baculovirus al momento de infección, reduciendo así, la proporción de medio condicionado con respecto al medio fresco y aumentando el rendimiento de glicoproteína G-his *tagged*.
- La formación de espuma es un problema frecuente en la producción de proteínas recombinantes en tanques agitados, por lo cual se recomienda el ingreso de oxígeno al medio de forma pulsada.
- Para escalar la producción de gpG-his tomando como base las condiciones de cultivo e infección en el biorreactor Biostat B-plus se recomienda emplear biorreactores con similar geometría.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agathos, S. N. (1996). Insect cell bioreactors. *Cytotechnology*, 20(1–3), 173–189. <https://doi.org/10.1007/BF00350398>
- Ailor, E., & Betenbaugh, M. (1999). Modifying secretion and post-translational processing in insect cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(2), 142–145. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)80024-X](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)80024-X)
- Alvarado E., J., Icochea D., E., Reyna S., P., Angulo J., C., Zegarra V., R., & V., R. Z. (2013). IMPACTO ECONÓMICO DE LARINGOTRAQUEITIS INFECCIOSA EN UNA GRANJA DE PONEDORAS EN LIMA, PERÚ. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 24(1), 86–91. <https://doi.org/10.15381/rivep.v24i1.1667>
- Andreasen, J. R., Glisson, J. R., Goodwin, M. A., Resurreccion, R. S., Villegas, P., & Brown, J. (1989). Studies of Infectious Laryngotracheitis Vaccines: Immunity in Layers. *Avian Diseases*, 33(3), 524. <https://doi.org/10.2307/1591116>
- Aucoin, M. G., Mena, J. A., & Kamen, A. A. (2010). Bioprocessing of baculovirus vectors: a review. *Current Gene Therapy*, 10(3), 174–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20380645>
- Bagust, T. J. (1986). Laryngotracheitis (gallid-1) herpesvirus infection in the chicken 4. latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus. *Avian Pathology*, 15(3), 581–595. <https://doi.org/10.1080/03079458608436317>
- Bedard, C., Kamen, A., Tom, R., & Massie, B. (1994). Maximization of recombinant protein yield in the insect cell/baculovirus system by one-time addition of nutrients to high-density batch cultures. *Cytotechnology*, 15(1–3), 129–138. <https://doi.org/10.1007/BF00762387>
- Bédard, C., Perret, S., & Kamen, A. A. (1997). Fed-batch culture of Sf-9 cells supports 3×10^7 cells per ml and improves baculovirus-expressed recombinant protein yields. *Biotechnology Letters*, 19(7), 629–632. <https://doi.org/10.1023/A:1018378529299>
- BÉDard, E. L. R., Kim, P., Jiang, J., Parry, N., Liu, L., Wang, H., ... Zhong, R. (2003). CHEMOKINE-BINDING VIRAL PROTEIN M-T7 PREVENTS CHRONIC REJECTION IN RAT RENAL ALLOGRAFTS. *Transplantation*, 76(1), 249–252. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000061604.57432.E3>
- Belyaev, A. S., & Roy, P. (1993). Development of baculovirus triple and quadruple expression vectors: co-expression of three or four bluetongue virus proteins and the

- synthesis of bluetongue virus-like particles in insect cells. *Nucleic Acids Research*, 21(5), 1219–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8385313>
- Blissard, G. W., & Rohrmann, G. F. (1989). Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 170(2), 537–555. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90445-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90445-5)
- Broerman y Edgington. (1931). Infectious Laryngotracheitis of Fowls. Retrieved from https://kb.osu.edu/dspace/bitstream/handle/1811/71955/1/OARDC_special_circular_n036.pdf
- Brown, M., & Faulkner, P. (1975). Factors affecting the yield of virus in a cloned cell line of *Trichoplusia ni* infected with a nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 26(2), 251–257. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(75\)90057-9](https://doi.org/10.1016/0022-2011(75)90057-9)
- Bryan, N. A., Davis-Poynter, N., Vanderplasschen, A., & Alcamí, A. (2003). Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *The EMBO Journal*, 22(4), 833–846. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg092>
- Butler, M., & Spearman, M. (2014). The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.06.010>
- Caron, A. W., Tom, R. L., Kamen, A. A., & Massie, B. (1994). Baculovirus expression system scaleup by perfusion of high-density Sf-9 cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(9), 881–891. <https://doi.org/10.1002/bit.260430907>
- Chico, E., & Jäger, V. (2000). Perfusion culture of baculovirus-infected BTI-Tn-5B1-4 insect cells: A method to restore cell-specific β -trace glycoprotein productivity at high cell density. *Biotechnology and Bioengineering*, 70(5), 574–586. [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20001205\)70:5<574::AID-BIT12>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20001205)70:5<574::AID-BIT12>3.0.CO;2-Q)
- Chisti Y (2000) Animal-cell damage in sparged bioreactors. *Trends Biotechnol* 18:420–432
- Chu, L., & Robinson, D. (2001). Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2), 180–187. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00197-X](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00197-X)
- Cruz, P. E., Cunha, A., Peixoto, C. C., Clemente, J., Moreira, J. L., & Carrondo, M. J. T.

- (1998). Optimization of the production of virus-like particles in insect cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 60(4), 408–418. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19981120\)60:4<408::AID-BIT2>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19981120)60:4<408::AID-BIT2>3.0.CO;2-Q)
- Davis, T. R., Wickham, T. J., McKenna, K. A., Granados, R. R., Shuler, M. L., & Wood, H. A. (1993). Comparative recombinant protein production of eight insect cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 29A(5), 388–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8314732>
- Deutschmann, S. M., & Jäger, V. (1994). Optimization of the growth conditions of Sf21 insect cells for high-density perfusion culture in stirred-tank bioreactors. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(6), 506–512. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90022-1](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90022-1)
- Devlin, J. M., Browning, G. F., Hartley, C. A., Kirkpatrick, N. C., Mahmoudian, A., Noormohammadi, A. H., & Gilkerson, J. R. (2006). Glycoprotein G is a virulence factor in infectious laryngotracheitis virus. *Journal of General Virology*, 87(10), 2839–2847. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82194-0>
- Devlin, J. M., Viejo-Borbolla, A., Browning, G. F., Noormohammadi, A. H., Gilkerson, J. R., Alcamí, A., & Hartley, C. A. (2010). Evaluation of immunological responses to a glycoprotein G deficient candidate vaccine strain of infectious laryngotracheitis virus. *Vaccine*, 28(5), 1325–1332. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.11.013>
- Doverskog, M., Bertram, E., Ljunggren, J., Ohman, L., Sennerstam, R., & Haggstrom, L. (2000). Cell Cycle Progression in Serum-Free Cultures of Sf9 Insect Cells: Modulation by Conditioned Medium Factors and Implications for Proliferation and Productivity. *Biotechnology Progress*, 16(5), 837–846. <https://doi.org/10.1021/bp000108i>
- Elias, C. B., Zeiser, A., Bédard, C., & Kamen, A. A. (2000). Enhanced growth of sf-9 cells to a maximum density of 5.2×10^7 cells per mL and production of β -galactosidase at high cell density by fed batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(4), 381–388. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000520\)68:4<381::AID-BIT3>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000520)68:4<381::AID-BIT3>3.0.CO;2-D)
- Emery, V. C., & Bishop, D. H. (n.d.). The development of multiple expression vectors for high level synthesis of eukaryotic proteins: expression of LCMV-N and AcNPV polyhedrin protein by a recombinant baculovirus. *Protein Engineering*, 1(4), 359–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3334094>

- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., & Ball, L. A. (2005). *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*.
- Felberbaum, R. S. (2015). The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnology Journal*, 10(5), 702–714. <https://doi.org/10.1002/biot.201400438>
- Fuchs, W., Veits, J., Helferich, D., Granzow, H., Teifke, J. P., & Mettenleiter, T. C. (2007). Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. *Veterinary Research*, 38(2), 261–279. <https://doi.org/10.1051/vetres:200657>
- Godwin, G., Belisle, B., Giovanni, A.D., Kohler, J., Gong, T., and Wojchowski, D. (1989). Serum-free growth and recombinant EPO expression in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells. *In Vitro* 25(3)
- Godwin G, Danner D, Gorfien S (1995) Express Five SFM: a new serum-free medium for growth of BTITN-5B1-4 cells and expression of recombinant proteins. *Focus* 17: 58-60.
- GRACE, T. D. C. (1962). Establishment of Four Strains of Cells from Insect Tissues Grown in vitro. *Nature*, 195(4843), 788–789. <https://doi.org/10.1038/195788a0>
- Groener, A. (1989) Host range of AcNPV, in *The Biology of Baculoviruses*, vol. 1, (Granados, R. R. and Federici, B. A., eds.), CRC, Boca Raton, FL, pp. 177–188.
- Handa-Corrigan, A., Emery, A. N., & Spier, R. E. (1989). Effect of gas—liquid interfaces on the growth of suspended mammalian cells: mechanisms of cell damage by bubbles. *Enzyme and Microbial Technology*, 11(4), 230–235. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(89\)90097-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(89)90097-5)
- Hensler, W., Singh, V., & Agathos, S. N. (1994). Sf9 insect cell growth and beta-galactosidase production in serum and serum-free media. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 745, 149–166.
- Hensler, W. T., & Agathos, S. N. (1994). Evaluation of monitoring approaches and effects of culture conditions on recombinant protein production in baculovirus-infected insect cells. *Cytotechnology*, 15(1–3), 177–186.
- Hink, W. F., Thomsen, D. R., Davidson, D. J., Meyer, A. L., & Castellino, F. J. (1991). Expression of three recombinant proteins using baculovirus vectors in 23 insect cell lines. *Biotechnology Progress*, 7(1), 9–14. <https://doi.org/10.1021/bp00007a002>

- Holtz KM, Anderson DK, Cox MM. Production of a recombinant influenza vaccine using the baculovirus expression vector system. *Bio- process J* 2003;2:25e32
- Huang, C.-J., Lin, H., & Yang, X. (2012). Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39(3), 383–99. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1082-9>
- Ikonomou, L., Bastin, G., Schneider, Y. J., & Agathos, S. N. (2001). Design of an efficient medium for insect cell growth and recombinant protein production. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 37(9), 549–59. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11710429>
- Jain, D., Ramasubramanyan, K., Gould, S., Seamans, C., Wang, S., Lenny, A., & Silberklang, M. (1991). Production of Antistatin Using the Baculovirus Expression System (pp. 97–110). <https://doi.org/10.1021/bk-1991-0477.ch008>
- Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., ... Vlak, J. M. (2006). On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Archives of Virology*, 151(7), 1257–1266. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0763-6>
- Kamen, A. A., Bédard, C., Tom, R., Perret, S., & Jardin, B. (1996). On-line monitoring of respiration in recombinant-baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactor cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(1), 36–48. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960405\)50:1<36::AID-BIT5>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960405)50:1<36::AID-BIT5>3.0.CO;2-2)
- Kavran, J. M., & Leahy, D. J. (2014). Lysis of mammalian and Sf9 cells. *Methods in Enzymology*, 536, 47–52. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420070-8.00004-0>
- Kelly, B. J., King, L. A., & Possee, R. D. (2007). Introduction to Baculovirus Molecular Biology (pp. 25–53). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-457-5_2
- King, L. A., Hitchman, R., & Possee, R. D. (2007). Recombinant baculovirus isolation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 388, 77–94. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-457-5_4
- Kioukia, N., Nienow, A. W., Al-Rubeai, M., & Emery, A. N. (1996). Influence of Agitation and Sparging on the Growth Rate and Infection of Insect Cells in Bioreactors and a Comparison with Hybridoma Culture. *Biotechnology Progress*, 12(6), 779–785. <https://doi.org/10.1021/bp9600703>
- Kitts, P. A., Ayres, M. D., & Possee, R. D. (1990). Linearization of baculovirus DNA

- enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. *Nucleic Acids Research*, 18(19), 5667–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2216760>
- Kitts, P. A., & Possee, R. D. (1993). A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *BioTechniques*, 14(5), 810–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8512707>
- Kloppinger, M.; Fertig, G.; Fraune, E.; Miltenburger, H. G. Multistage production of *Autographa Californica* nuclear polyhedrosis virus in insect cell cultures. *Cytotechnology* 1990, 4, 271-278.
- Lazarte, J. E., Tosi, P.-F., & Nicolau, C. (1992). Optimization of the production of full-length rCD4 in baculovirus-infected Sf9 cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 40(2), 214–217. <https://doi.org/10.1002/bit.260400204>
- Leusch, M. S., Lee, S. C., & Olins, P. O. (1995). A novel host-vector system for direct selection of recombinant baculoviruses (bacmids) in *Escherichia coli*. *Gene*, 160(2), 191–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7642094>
- Licari, P., & Bailey, J. E. (1991). Factors influencing recombinant protein yields in an insect cell-baculovirus expression system: Multiplicity of infection and intracellular protein degradation. *Biotechnology and Bioengineering*, 37(3), 238–246. <https://doi.org/10.1002/bit.260370306>
- Ljunggren, J., Alarcon, M., Ramqvist, A.-K., Westlund, A., & Öhman, L. (1999). A Method to Determine the Optimal Time to Infect Insect Cells with the Baculovirus Expression System. In *Animal Cell Technology: Products from Cells, Cells as Products* (pp. 359–361). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/0-306-46875-1_77
- Lucas, A., & McFadden, G. (2004). Secreted immunomodulatory viral proteins as novel biotherapeutics. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 173(8), 4765–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15470015>
- Luckow, V. A., Lee, S. C., Barry, G. F., & Olins, P. O. (1993). Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *Journal of Virology*, 67(8), 4566–79. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8392598>
- Lynn, D. E. (1999). Development of insect cell lines: Virus susceptibility and applicability to prawn cell culture. *Methods in Cell Science*, 21(4), 173–181.

<https://doi.org/10.1023/A:1009824207045>

- Maioresella, B., Inlow, D., Shauger, A., & Harano, D. (1988). Large-Scale Insect Cell-Culture for Recombinant Protein Production. *Nature Biotechnology*, 6(12), 1406–1410. <https://doi.org/10.1038/nbt1288-1406>
- Maranga, L., Cruz, P. E., Aunins, J. G., & Carrondo, M. J. T. (2002). Production of Core and Virus-Like Particles with Baculovirus Infected Insect Cells. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 74.
- Maranga, L., Cunha, A., Clemente, J., Cruz, P., & Carrondo, M. J. T. (2004). Scale-up of virus-like particles production: effects of sparging, agitation and bioreactor scale on cell growth, infection kinetics and productivity. *Journal of Biotechnology*, 107(1), 55–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14687971>
- McCue, J., Kshirsagar, R., Selvitelli, K., Lu, Q., Zhang, M., Mei, B., ... Reichert, H. (2015). Manufacturing process used to produce long-acting recombinant factor VIII Fc fusion protein. *Biologicals*, 43(4), 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2015.05.012>
- Meghrou, J., Mahmoud, W., Jacob, D., Chubet, R., Cox, M., & Kamen, A. A. (2009). Development of a simple and high-yielding fed-batch process for the production of influenza vaccines. *Vaccine*, 28(2), 309–16. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.10.048>
- Meij, P., Vervoort, M. B. H. J., de Gooijer, K., Bloemena, E., Meijer, C. J. L. M., & Middeldorp, J. M. (2000). Bioreactor-Scale Production and One-Step Purification of Epstein–Barr Nuclear Antigen 1 Expressed in Baculovirus-Infected Insect Cells. *Protein Expression and Purification*, 20(2), 324–333. <https://doi.org/10.1006/prep.2000.1324>
- Ohman, L., Alarcon, M., Ljunggren, J., Ramqvist, A.-K., & Hoggstrom, L. (1996). Glutamine is not an essential amino acid for Sf-9 insect cells. *Biotechnology Letters*, 18(7), 765–770. <https://doi.org/10.1007/BF00127885>
- Palomares, L. A., & Ramirez, O. T. (1996). The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture. *Cytotechnology*, 22(1–3), 225–237. <https://doi.org/10.1007/BF00353943>
- Palomares, L. a, Pedroza, J. C., & Ramírez, O. T. (2001). Cell size as a tool to predict the production of recombinant protein by the insect-cell baculovirus expression system. *Biotechnology Letters*, 23, 359–364.

- Pirt, S. J. (1975) Principles of Microbe and Cell Cultivation. John Wiley & Sons, New York.
- Radford, K. M., Cavegn, C., Bertrand, M., Bernard, A. R., Reid, S., & Greenfield, P. F. (1997). The indirect effects of multiplicity of infection on baculovirus expressed proteins in insect cells: secreted and non-secreted products. *Cytotechnology*, 24, 73–81. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3449608/pdf/10616_2004_Article_122408.pdf
- RAM Kripa, HATTON Diane, AHUJA Sanjee, BENDER Jean, H. A. and T. R. (2016). Protein Production in Eukaryotic Cells. *Topics in Medicinal Chemistry*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/7355_2016_3
- Rhiel, M., Mitchell-Logean, C. M., & Murhammer, D. W. (1997). Comparison of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (high five) and *Spodoptera frugiperda* Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 55(6), 909–20. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970920\)55:6<909::AID-BIT8>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970920)55:6<909::AID-BIT8>3.0.CO;2-K)
- Rohrmann, G. F. (2013). Host resistance, susceptibility and the effect of viral infection on host molecular biology. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138303/>
- Rosano, G. L., Ceccarelli, E. A., Neubauer, P., Bruno-Barcena, J. M., & Schweder, T. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Schmid, G. (1996). Insect cell cultivation: growth and kinetics. *Cytotechnology*, 20(1–3), 43–56. <https://doi.org/10.1007/BF00350388>
- Shil, N. K., Markham, P. F., Noormohammadi, A. H., O'Rourke, D., & Devlin, J. M. (2012). Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect Chicken Serum Antibody to Glycoprotein G of Infectious Laryngotracheitis Virus. *Avian Diseases*, 56(3), 509–515. <https://doi.org/10.1637/10054-010912-Reg.1>
- Smith, G. E., & Summers, M. D. (1978). Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. *Virology*, 89(2), 517–527. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(78\)90193-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(78)90193-9)
- Smith, G. E., Summers, M. D., & Fraser, M. J. (1983). Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and Cellular Biology*, 3(12), 2156–65. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6318086>

- Singh, V. (1999). Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. *Cytotechnology*, 30(1–3), 149–158. <https://doi.org/10.1023/A:1008025016272>
- Trinh, K., Garcia-Briones, M., Chalmers, J. J., & Hink, F. (1994). Quantification of damage to suspended insect cells as a result of bubble rupture. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(1), 37–45. <https://doi.org/10.1002/bit.260430106>
- Van Lier, F. L. J., van den End, E. J., de Gooijer, C. D., Vlak, J. M., & Tramper, J. (1990). Continuous production of baculovirus in a cascade of insect-cell reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 43–47. <https://doi.org/10.1007/BF00170567>
- Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., et al (2000). Virus Taxonomy : Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press.
- Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J., & McCawley, P. (1977). The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro*, 13(4), 213–217.
- Volkman, L. E., Goldsmith, P. A., Hess, R. T., & Faulkner, P. (1984). Neutralization of budded *Autographa californica* NPV by a monoclonal antibody: identification of the target antigen. *Virology*, 133(2), 354–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18639808>
- Walsh, G., & Jefferis, R. (2006). Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nature Biotechnology*, 24(10), 1241–1252. <https://doi.org/10.1038/nbt1252>
- Weber, W., Weber, E., Geisse, S., & Memmert, K. (2002). Optimisation of protein expression and establishment of the Wave Bioreactor for Baculovirus/insect cell culture. *Cytotechnology*, 38(1–3), 77–85. <https://doi.org/10.1023/A:1021102015070>
- Weiss, S. A., Smith, G. C., Kalter, S. S., & Vaughn, J. L. (1981). Improved method for the production of insect cell cultures in large volume. *In Vitro*, 17(6), 495–502. <https://doi.org/10.1007/BF02633510>
- Whitley, R. J., & Roizman, B. (2001). Herpes simplex virus infections. *The Lancet*, 357(9267), 1513–1518. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04638-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04638-9)
- Wild, M. A., Cook, S., & Cochran, M. (1996). A genomic map of infectious laryngotracheitis virus and the sequence and organization of genes present in the unique short and

flanking regions. *Virus Genes*, 12(2), 107–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8879127>

Wong, K. T. K., Peter, C. H., Greenfield, P. F., Reid, S., & Nielsen, L. K. (2000). Low multiplicity infection of insect cells with a recombinant baculovirus: The cell yield concept. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(6), 659–666. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960320\)49:6<659::AID-BIT7>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960320)49:6<659::AID-BIT7>3.0.CO;2-N)

X. ANEXOS

ANEXO 1

Criopreservación celular

La criopreservación celular se realizó modificando el protocolo descrito previamente por Aghatos (Aghatos, 2007)

Se cosecharon células en fase media exponencial con una densidad de $\sim 3,2 \times 10^6$ cel/mL. Se centrifugaron a una velocidad de 600 rpm por 5 minutos a 4 grados centígrados. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular fue resuspendido en el medio de criopreservación celular CryoStor® a una densidad de $\sim 30 \times 10^6$ cel/mL. De manera inmediata se transfirió 1 mL de la suspensión celular a viales de criopreservación y se colocaron a 4 grados centígrados durante 30 minutos. Luego, se homogenizó la suspensión celular y se colocó a -20 grados centígrados durante 2 horas para luego ser transferidos a -80 grados centígrados y almacenados *overnight*. Finalmente, los viales fueron almacenados en nitrógeno líquido por tiempo indefinido.

ANEXO 2

Descongelamiento celular

Las células fueron descongeladas siguiendo el protocolo descrito por (Aghatos, 2007):

- Las células fueron retiradas del nitrógeno líquido y colocadas en baño maría a 37 grados centígrados durante 2 minutos.
- Las células fueron colocadas en 10 mL de medio frío en un tubo Falcon.
- Las células fueron centrifugadas a 600 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular fue resuspendido en 5 mL de medio a 27 grados centígrados.

- Se determinó la densidad y la viabilidad celular. Las células fueron sembradas a una densidad de $0,5 \times 10^6$ cel/mL en un matraz Erlenmeyer con 30 mL de volumen.
- Cuando el cultivo alcanzó una densidad mayor a 3×10^6 cel/mL y una viabilidad superior al 95%, las células fueron subcultivadas en un *spinner* a $0,8 \times 10^6$ cel/mL

ANEXO 3

Subcultivo celular

Para el mantenimiento de las células Sf-9 en *spinners* se realizaron algunas modificaciones del protocolo descrito por Aghatos, 2007.

- Se sembraron las células provenientes de un cultivo en fase media exponencial a una densidad de $0,8 \times 10^6$ cel/mL ó $0,5 \times 10^6$ cel/mL. Las tapas de los brazos laterales del *spinner* fueron aflojadas (1/4 de vuelta) para mejorar la oxigenación en el cultivo. Las células fueron mantenidas a 27 grados centígrados y a una velocidad de agitación de 125 rpm.
- El cultivo fue pasajeado (subcultivado) cuando las células alcanzaron una densidad de $\sim 3,2 \times 10^6$ cel/mL (segundo día de crecimiento, si fueron sembradas a $0,8 \times 10^6$ cel/mL) o alcancen una densidad de 4×10^6 cel/mL (tercer día de crecimiento, si fueron sembradas a $0,5 \times 10^6$ cel/mL).
- El monitoreo de la densidad y viabilidad celular fue registrado en cada pasaje.

A su vez, la presencia de agentes contaminantes como *Mycoplasma spp.*, bacterias, mohos y levaduras fue monitoreada una vez por semana.

ANEXO 4

Protocolo de cuantificación del baculovirus BV-gpG mediante Ensayo en Placa

Se modificó el protocolo descrito previamente por O'Reilly *et al.*, 1994.

Protocolo:

- Se sembró 1×10^6 células Sf-9 por pocillo en una placa de 6 pocillos. El volumen sembrado fue de 2 mL. Se dejó que las células se adhieran a la placa por al menos 1 hora a temperatura ambiente.
- Durante el periodo de incubación, se preparó diluciones seriadas (1 en 10) del baculovirus. (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}).
- Una vez transcurrida la hora de incubación, observando que se haya formado una monocapa subconfluyente de células, se retiró el sobrenadante de cada pocillo, sin perturbar la monocapa y se colocó 1 mL de las diluciones virales 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} y 1 mL de medio como se indica en la Figura 19. Se tuvo cuidado de no desprender las células con la fuerza de la adición del baculovirus y/o medio a la placa.
- Se dejó incubando la placa por 1 hora a temperatura ambiente.
- Durante el periodo de incubación, se preparó el medio de plaqueo. Se mezcló 15 mL del medio Grace 2X (Gibco, cat. no. 11667-037) con 13,8 mL de agarosa ultrapura (Invitrogen, cat. no. 16.520-100) preparada al 4% y 1,2 mL de suero fetal bovino; además, se adicionó cloranfenicol 2,1 mg/mL. Se mantuvo el medio de plaqueo a 41 grados centígrados para evitar la polimerización de la agarosa.
- Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el sobrenadante de cada pocillo e inmediatamente se añadió 2 mL del medio de plaqueo. Se dejó incubando por 15 minutos para permitir que la capa de agarosa se solidifique.
- Se incubó la placa en cámara húmeda (una bolsa con papel humedecido en su interior) a 27 grados centígrados durante 8 a 10 días.
- Pasado los días de incubación, se fijó la placa de cultivo, añadiendo 1 mL de ácido tricloroacético al 20% durante 4 horas, se retiró el gel de agarosa con chorros de agua destilada, se dejó secar por 3 minutos a 37 grados centígrados y se colocó 1 mL de cristal violeta al 1% en etanol al 20% durante 5 minutos para realizar la

tinción de las placas. Se retiró el exceso de cristal violeta, lavando la placa con agua destilada.

- Se determinó el título viral según la fórmula descrita en la ecuación 9.

Ecuación 9.

$$\text{Título viral} \frac{\text{pfu}}{\text{mL}} = \frac{\text{número de placas} * \text{factor de dilución}}{\text{volumen de virus}}$$

Donde:

- Número de placas: se utilizó el conteo del pocillo que presentó entre 10 y 30 unidades formadoras de placas (pfu).
- Factor de dilución: se multiplicó por la inversa de la dilución empleada en el pocillo donde se contaron las placas.
- Volumen de virus: En el presente ensayo, se dividió por 1, ya que se añadió 1 mL del baculovirus para la infección.

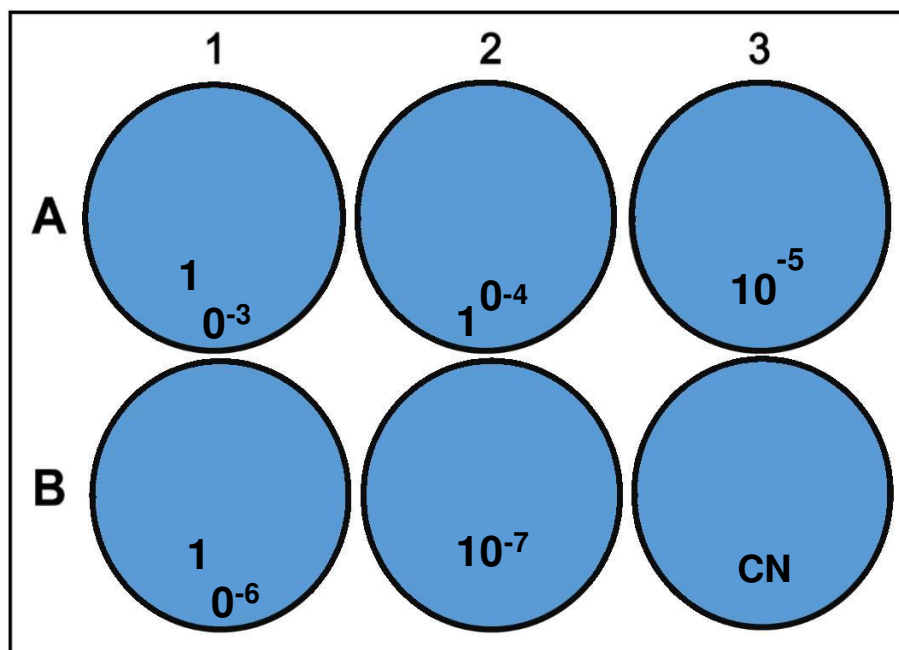


Figura 19. Placa utilizada para la titulación del baculovirus. Donde 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} son las diluciones del baculovirus colocadas en cada pocillo para la infección de células Sf-9 y CN, el control negativo (células Sf-9 sin infectar).

ANEXO 5

Protocolo de detección de la gpG-his mediante *Western Blot*

El protocolo de detección de la glicoproteína G-his tagged fue dividido en 3 etapas: Una etapa de separación de proteínas mediante SDS-PAGE; una segunda etapa de transferencia de proteínas y una tercera etapa de inmunodetección mediante el empleo de anticuerpos específicos.

☐ **Separación de proteínas mediante SDS-PAGE**

Se empleó el sistema de transferencia en cámara vertical mini PROTEAN II (Bio-Rad). Los geles fueron preparados al 10% (gel separador) y 5% (gel concentrador), según las indicaciones de Sambrook & Russell, 2001.

Procedimiento:

- Se prepararon los geles de poliacrilamida
- Las muestras fueron diluidas en buffer 4X SDS y calentadas a 100 grados centígrados por 5 minutos.
- Los geles fueron colocados en la cubeta de electroforesis y cubiertos con el buffer de electroforesis 1X. Se cargaron las muestras
- Las muestras fueron corridas a 50 V por 45 minutos y luego a 100 V hasta que el frente de corrida alcanzó el final del gel

☐ **Transferencia de proteínas**

Se realizó el método de transferencia semiseca, empleando el eBlot™ Protein Transfer Device (GenScript, Cat. No. L03010) y el eBlot™ Protein Transfer Pads (GenScript, Cat. No. L03011). El proceso de transferencia se realizó siguiendo las indicaciones del manual de usuario de la marca (eBlot™ Protein Transfer System. Versión No. 08152014).

Procedimiento:

- Se colocó el eBlot™ Anode Pad sobre la placa del dispositivo
- Se colocó la membrana de nitrocelulosa, previamente equilibrada en el *buffer* de transferencia durante 1 minuto.
- Cuidadosamente, se colocó el gel sobre la membrana. Las burbujas fueron removidas
- Se colocó el eBlot™ Cathode Pad
- Se dio inicio a la transferencia (configurado para 7 minutos)

Se tomó como referencia de una transferencia efectiva, la visualización de las bandas del *ladder* en la membrana.

☐ **Inmunodetección por anticuerpos**

La detección de gpG-his fue realizada por un anticuerpo monoclonal de ratón anti-his conjugado con HRP (GenScript, cat no. A00612).

Procedimiento:

- La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada durante 1 hora con *buffer* de bloqueo en agitación.
- Se retiró el buffer de bloqueo y se añadió el anticuerpo diluido 1/10 000 en agua ultrapura. Se dejó incubando *overnight* a 4 grados centígrados.
- La membrana fue lavada 3 veces en *buffer* TTBS (10 minutos cada lavado)
- Se reveló la membrana, empleando el substrato DAB en tableta (Sigma-Aldrich, cat. No. D0426), disuelta en 5 mL de agua ultrapura. Las bandas aparecieron después de 2 a 5 minutos.

ANEXO 6

Preparación de Buffers para Western Blot

A. Buffer de carga: 4XSDS

250 mM	Tris-HCl, pH 6.8
8%	SDS
10%	glicerol
0.04% (w/v)	azul de bromofenol
4% (v/v)	β -mercaptoetanol

Preparación: Se disolvió el Tris-HCL en H₂O destilada y se ajustó el pH a 6,8, de agregó el azul de bromofenol y se adicionó el SDS. El buffer fue almacenado a 4 grados centígrados. Antes de su uso se agregó el β mercaptoetanol.

B. Buffer de electroforesis 5X (1 L)

Tris base	15.1 g
Glicina	93.8 g
SDS al 10%(w/v)	50 mL

Preparación: Se disolvió el Tris base y la glicina en 500 mL de H₂O destilada y se ajustó el pH a 8,3, luego se agregó el SDS al 10%, y se completó el volumen con agua hasta 1 L. Para la corrida se empleó el *buffer* a 1X.

C. Buffer TTBS

10 mM	Tris-HCL, pH 7,4
150 mM	NaCL
0,1%	Tween 20

Preparación: Se disolvió el NaCL en agua destilada y se agregó el Tris-HCL, una vez disuelto se ajustó el pH a 7,4 y se añadió Tween 20. El *buffer* fue mantenido a 4 grados centígrados

D. Buffer de bloqueo A (1 L)

BSA	50 g
Buffer PBS	1 000 mL.

Preparación: Se disolvió el BSA en *buffer* PBS.

E. *Buffer* PBS 1X (1 L)

NaCL	8 g
KCL	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O	115 g

Preparación: Se disolvió el NaCL en H₂O destilada, se añadió KCL y se disolvió, finalmente se añadió Na₂HPO₄-7H₂O y se disolvió. Se ajustó el pH a 7,4.

ANEXO 7

Preparación de *Buffers* para ELISA sándwich

A. *Buffer* carbonatado (1 L)

NaHCO ₃	4,3 g
Na ₂ CO ₃	5,3 g

Preparación: Se disolvió el NaHCO₃ en H₂O destilada, se añadió Na₂CO₃ y se disolvió. Se ajustó el pH a 9,4

B. *Buffer* de lavado (1 L)

Tween 20	0,5 mL
<i>Buffer</i> PBS	1 000 mL

Preparación: Se disolvió el Tween 20 en *buffer* PBS.

C. *Buffer* de bloqueo B (1 L)

<i>Buffer</i> PBS	1 000 mL
BSA	5 g
Tween 20	1 mL

Preparación: Se disolvió el BSA en *buffer* PBS y se añadió Tween 20.

ANEXO 8

BIORREACTOR BIOSTAT B PLUS cc-Twin



Figura 20. Puesta en funcionamiento del Biorreactor Biostat B plus-cc twin. Se muestra la torre control y dos recipientes con cultivo de células Sf-9.

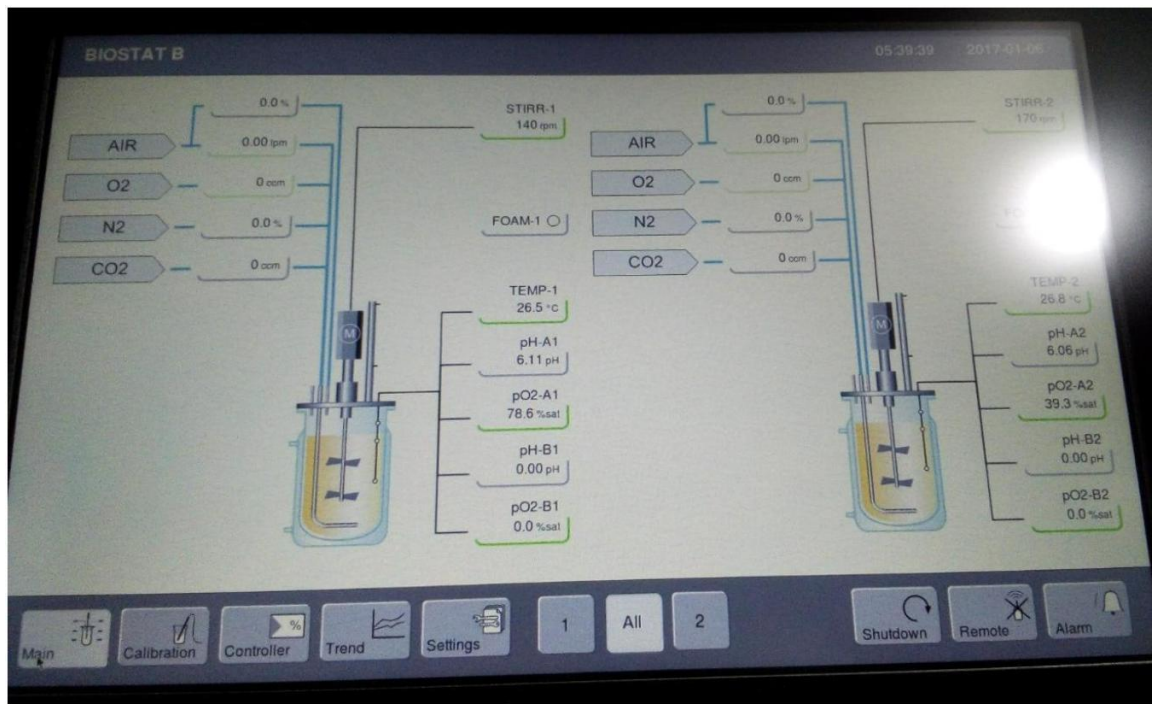


Figura 21. Pantalla de control de parámetros operacionales en el Biorreactor Biostat B plus-cc twin. Se observa dos configuraciones diferentes para cada cultivo. Al lado izquierdo, cultivo mantenido a 140 rpm. Al lado derecho, cultivo mantenido a 170 rpm.

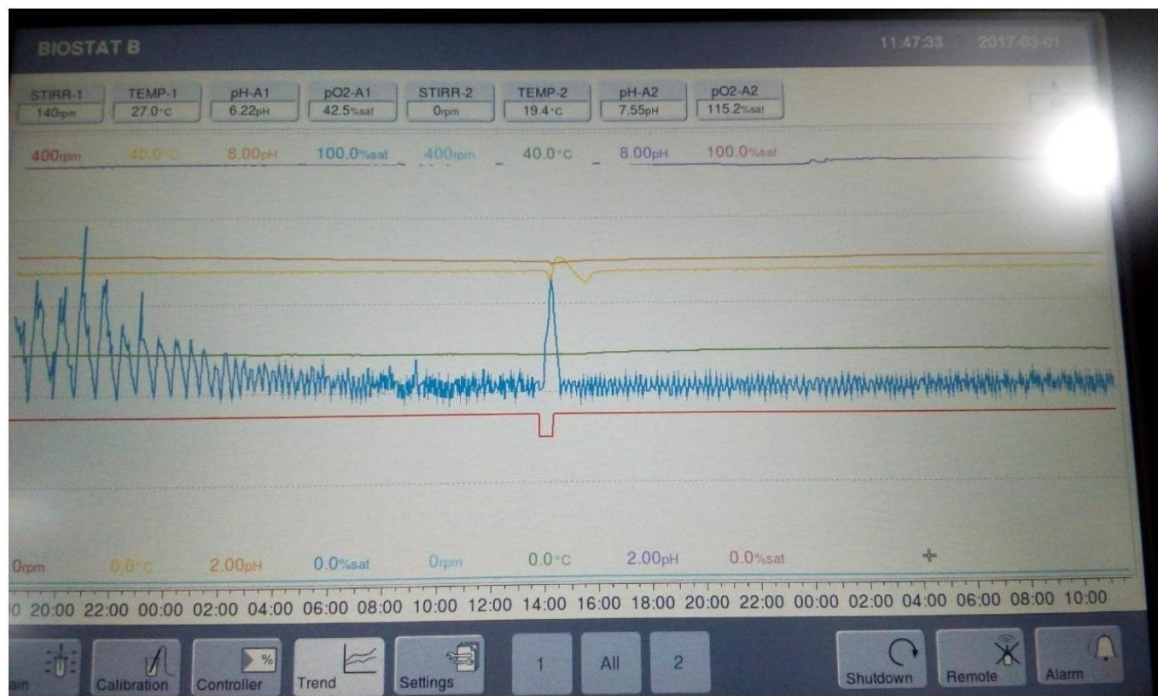


Figura 22. Pantalla mostrando el comportamiento en tiempo real de las variables: O₂, temperatura, pH y velocidad de agitación en el cultivo (lado izquierdo)